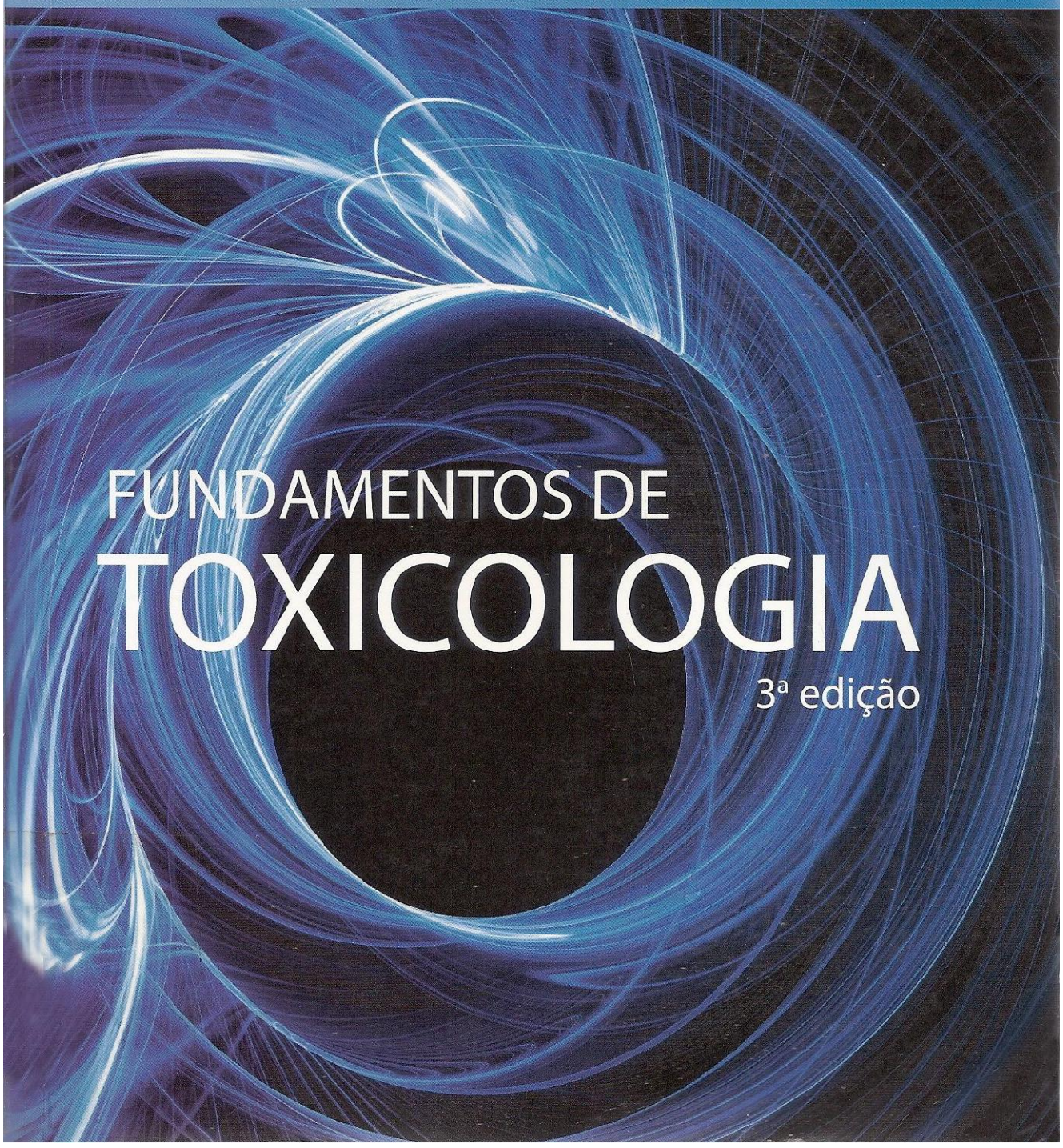
Grupo Zanini • Oga
USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS

Seizi Oga
Márcia Maria de Almeida Camargo
José Antonio de Oliveira Batistuzzo



# FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA

3ª edição

**SEIZI OGA** é farmacêutico-bioquímico graduado pela Faculdade de Farmácia e Bioquímica da USP, doutor e livre-docente em Farmacologia. Especializado em Farmacologia Bioquímica na University of Chiba, Japão, iniciou, no Brasil, pesquisas na área de biotransformação de drogas. Foi consultor sobre medicamentos de diversos órgãos, como o Conselho Federal de Farmácia, o Ministério da Saúde e a Secretaria de Estado da Saúde. Foi diretor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e é Professor Titular de Toxicologia na mesma faculdade.

**MÁRCIA MARIA DE ALMEIDA CAMARGO** é farmacêutica-bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e mestre em Análises Clínicas e Toxicológicas. Atuou como Perita-Criminal da Polícia Federal, foi instrutora de cursos de cromatografia da empresa de equipamentos Agilent e atualmente dedica-se ao controle anti-dopagem, acumulando vasta experiência em análises toxicológicas adquirida ao longo de 23 anos de carreira no Departamento de Controle e Pesquisas Antidopagem do Jockey Club de São Paulo.

**JOSÉ ANTONIO DE OLIVEIRA BATISTUZZO** é farmacêutico-bioquímico pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, especialista em farmácia magistral pela Anfarmag, assessor das farmácias Biofórmula, Byofórmula e Ophthalmos, gerente do Instituto Paulista de Microbiologia Aplicada, consultor da Acesso Magistral Consultoria Farmacêutica, professor de Farmacoterapia do CBES, Equilibra, Unipam e Unifor, professor e coordenador do Curso de Pós-Graduação em Farmácia Magistral da Faculdade Oswaldo Cruz, Autor do livro Formulário Médico-Farmacêutico, Editora Pharmabooks, em co-autoria com Masayuki Itaya e Yukiko Eto.

**OBRAS DO GRUPO ZANINI-OGA**

Farmacologia Aplicada – (1979, 1982, 1985, 1989 e 1994)
Farmacologia Integrada – (1988 e 1991)
Medicamentos e suas interações – (1994)
GUIAMED – Guia de Medicamentos – (1995 e 1998)
Fundamentos de Toxicologia – (1996*, 2003 e 2008)
Miniguia de Produtos Farmacêuticos – Alternativas de prescrição – (1997)
Compliance – Sobre o encontro paciente/médico – (1997)
DCIP – Denominações comuns internacionais em português – (1999)
Dicionário de Medicamentos Genéricos – (1999 e 2001)
Guia Zanini-Oga de Interações Medicamentosas – (2002)
* Prêmio Jabuti da Câmara Brasileira do Livro, em 1997. Prêmio Racine-Qualidade, em 1998.

ATHENEU EDITORA SÃO PAULO LTDA.
São Paulo, SP, Brasil
www.atheneu.com

9 788574 540986

GRUPO ZANINI • OGA
USO RACIONAL DE MEDICAMENTOS

# FUNDAMENTOS DE TOXICOLOGIA

**Terceira Edição**

Seizi Oga

Márcia Maria de Almeida Camargo

José Antonio de Oliveira Batistuzzo

**ATHENEU EDITORA SÃO PAULO**
Rua Marconi, 131 – 2º andar
01047-910 – São Paulo – SP
Fone: (11) 3255-1606 – Fax: (11) 3255-1798
http://www.atheneu.com – e-mail: atheneu@atheneu.com

Sem autorização escrita, nenhuma parte do livro poderá, de forma alguma, ser reproduzida (seja por fotocópia, microfilme ou outro método), nem ser adaptada, reproduzida ou distribuída mediante aplicação de sistemas eletrônicos, estando o infrator sujeito às penalidades previstas no Código Penal, a saber: reclusão de um a quatro anos.

Copyright © ATHENEU EDITORA SÃO PAULO, 2008.

Diagramação: *Know-How Editorial*

ISBN: 978-85-7454-098-6

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**
**(Câmara Brasileira do Livro, SP, Brasil)**

Oga, Seizi, 1937-
Fundamentos de toxicologia / Seizi Oga, Márcia Maria de Almeida Camargo, José Antonio de Oliveira Batistuzzo. -- 3. ed. -- São Paulo : Atheneu Editora, 2008.

"Grupo Zanini-Oga : uso racional de medicamentos"
Vários colaboradores.
Bibliografia.

1. Toxicologia I. Camargo, Márcia de Almeida. II. Batistuzzo, José Antonio de Oliveira. III. Título.

CDD-615.9
08-00194 NLM-QV-600

**Indíces para catálogo sistemático:**

1. Toxicologia 615.9

**Endereço para correspondência com os autores**
Av. Brigadeiro Luis Antonio, 4.830
São Paulo – SP – Brasil
cep 01402-002
E-mail: batistuzzo@gmail.com

Editores

SEIZI OGA
Professor Titular de Toxicologia do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

MÁRCIA MARIA DE ALMEIDA CAMARGO
Mestre em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

JOSÉ ANTONIO DE OLIVEIRA BATISTUZZO
Farmacêutico-Bioquímico pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

# Colaboradores

- **Acácio Alves de Souza Lima Filho**

  Farmacêutico-Bioquímico pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Doutor em Ciências Visuais pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp, Chefe do Setor de Farmacologia Ocular do Departamento de Oftalmologia da Unifesp.

- **Alice A. da Matta Chasin**

  Doutora em Toxicologia pela USP, Professora Titular de Toxicologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica Oswaldo Cruz e da Universidade São Judas, Perita Criminal Toxicologista do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo, Professora de Toxicologia Forense no programa de pós-graduação em Toxicologia da FCF-USP e da Academia de Polícia do Estado de São Paulo.

- **Adriana Pileggi**

  Especialista em Psiquiatria pela Associação Brasileira de Psiquiatria.

- **André Malbergier**

  Professor de Pós-Graduação do Depto. de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP, Coordenador Executivo do Grupo Interdisciplinar de Estudos de Alcoolismo e Farmacodependências (GREA) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

- **Angélica Yochiy**

  Farmacêutica-Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP, Mestre em Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e Doutoranda em Neurociências e Comportamento pelo Instituto de Psicologia da USP.

- **Carlos Alberto Tagliati**

  Professor Associado do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais.

- **Cristiana Leslie Corrêa**

  Farmacêutica, Doutora em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Professora de Toxicologia do Curso de Ciências Farmacêuticas da Pontifícia Universidade Católica de Campinas e Diretora Técnica da Planitox – *The Science-based Toxicology Company*.

- **Cristina Sanches**

  Farmacêutica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina, Mestre em Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Doutora em Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Daniela Mendes Louzada de Paula**

  Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Farmacêutica-Bioquímica do Laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

- **Danielle Palma de Oliveira**

  Mestre e Doutora em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Professora da Disciplina de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP.

- **Darciléia Alves do Amaral**

  Médica pela Faculdade de Medicina da USP, Especialista em Pediatria, Coordenadora do Centro de Controle de Intoxicações de São Paulo – CCISP, Diretora Científica da Associação Brasileira de Centros de Informação e Assistência Toxicológica e Toxicologistas Clínicos – ABRACIT.

- **David Domingues Pavanelli**

  Químico, Doutor em Ciências – Bioquímica pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

- **Dulcineia Saes Parra Abdalla**

  Professora Titular do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Edmundo Garcia Agudo**

  Doutor em Ciências Químicas.

- **Edna Maria Alvarez Leite**

  Doutora em Toxicologia pela FCF/USP, Professora Associada I do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

- **Edna Maria Miello Hernandez**

  Farmacêutica Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Farmacêutica Toxicologista do Centro de Controle de Intoxicações de São Paulo.

- **Erasmo Soares da Silva**

  Mestre em Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Professor de Toxicologia da Universidade São Judas e Perito Criminal Toxicologista do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo.

- **Ernani Pinto**

  Professor Doutor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Fábio Kummrow**

  Mestre e Doutor em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Universidade de São Paulo, Professor do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal de Alfenas – Unifal, Minas Gerais.

- **Fábio Siviero**

  Doutor em Bioquímica do Instituto de Química da USP, Pesquisador do Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

- **Georgino Honorato de Oliveira**

  Professor Adjunto do Depto. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – *Campus* de Araraquara.

- **Gláucia Maria Machado-Santelli**

  Professora Titular do Depto. de Biologia Celular e do Desenvolvimento do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

- **Henrique V. Della Rosa**

  Professor Doutor do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Diretor Científico da Toxikon Assessoria Toxicológica S/C Ltda.

- **Herling Gregório Aguilar Alonzo**

  Médico com Especialização em Toxicologia Clínica e Ambiental, Doutor em Saúde Coletiva pela Unicamp, Consultor da Coordenação Geral de Vigilância Ambiental em Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde.

- **Ione Pellegatti Lemonica**

  Profa. Dra. Aposentada do Depto. de Farmacologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Campus de Botucatu, Especialista em Toxicologia da Reprodução.

- **Irene Videira de Lima**

  Doutora em Toxicologia pela USP, Mestre em Análises Toxicológicas pela USP, Professora de Toxicologia do Curso de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Medicina do ABC – Fundação ABC, Perita Criminal do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo.

- **João Brasil Vita Sobrinho**

  Médico Oftalmologista, Mestre em Oftalmologia pela Escola Paulista de Medicina da Universidade Federal de São Paulo – Unifesp.

- **João Ferreira Galvão**

  Doutor em Toxicologia pela USP, Professor Titular do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

- **José Luiz da Costa**

  Mestre em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Doutorando em Química Analítica pelo Instituto de Química da USP, Perito Criminal do Núcleo de Análise Instrumental do Instituto de Criminalística do Estado de São Paulo, Professor das Disciplinas Análise Instrumental e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas Oswaldo Cruz, São Paulo.

- **José Salvador Lepera**

  Professor Doutor do Depto. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – *Campus* de Araraquara.

- **Karin Jannet Vera López**

  Farmacêutica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Católica de Santa Maria, Arequipa – Peru, Doutora em Farmácia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Karina Helena Morais Cardozo**

  Doutoranda do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Química da USP.

- **Luciane Aparecida Faine**

  Doutora do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Maria das Graças Almeida**

  Doutora em Farmacologia pela USP, Professora Associada do Depto. de Análises Clínicas e To-

xicológicas do Centro de Ciência da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

- **Maria das Graças Silva de Jesus**

  Perita Criminal Toxicologista do Núcleo de Toxicologia Forense do Instituto Médico Legal de São Paulo.

- **Maria de Fátima Menezes Pedrozo**

  Doutora em Saúde Pública pela USP (Saúde Ambiental), Mestre em Análises Toxicológicas – FCF/USP, Farmacêutica-Bioquímica pela FCF/USP, Professora de Toxicologia da Universidade Mackenzie e Toxicologista do Núcleo Análise Instrumental – Centro de Exames, Análises e Pesquisa do Instituto de criminalística de São Paulo.

- **Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira**

  Doutora em Toxicologia e Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e Professora Titular da Universidade Federal de Alfenas.

- **Maria Helena Roquetti Humaytá**

  Bióloga e Licenciada em Ciências Biológicas pela Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da USP – *Campus* de Ribeirão Preto.

- **Maria Zilda Nunes Carrazza**

  Farmacêutica-Bioquímica e Doutora em Toxicologia pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Chefe do Laboratório de Emergências Toxicológicas do Centro de Controle de Intoxicações de São Paulo.

- **Mauricio Yonamine**

  Professor Doutor do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Diretor do Laboratório de Análises Toxicológicas da USP (LAT-USP).

- **Myrna Sabino**

  Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

- **Nilda A. G. G. de Fernícola**

  Farmacêutica-Bioquímica, Doutora em Toxicologia pela Universidade de Buenos Aires, Argentina. Assessora permanente em Toxicologia da Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde.

- **Paula Kujbida**

  Mestre em Toxicologia e Análise Toxicológica pela USP, Doutoranda do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Paulo Eduardo de Toledo Salgado**

  Professor Titular do Depto. de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – *Campus* de Araraquara.

- **Pio Colepicolo**

  Professor Titular do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP.

- **Regina Lúcia de Moraes Moreau**

  Professora Doutora do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Rosa Maria de Sá Trevisan**

  Bióloga, especialista em Saneamento Ambiental e Mestre em Saúde Coletiva pela Unicamp.

- **Rosemary Custódio Pedroso**

  Professora Doutora do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Rúbia Kuno**

  Farmacêutica-Bioquímica pela Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto da USP, Especialista em Engenharia de Controle de Poluição pela Faculdade de Saúde Pública da USP, Mestre em Saúde Pública, área de concentração Epidemiologia, Doutoranda em Ciências pelo Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP e Gerente do Setor de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB (SP).

- **Samuel Schvartsman**

  Professor Associado do Depto. de Pediatria da Faculdade de Medicina da USP.

- **Sandra Helena P. Farsky**

  Farmacêutica Industrial pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP Ribeirão Preto, Doutora em Ciências (Farmacologia) pelo Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Professora Livre-Docente (Toxicologia) pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Sandra Scivoletto**

  Doutora em Psiquiatria do Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP, Chefe do Ambulatório de Adolescentes do Serviço de Psiquiatria da Infância e Adolescência (SEPIA) do Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da FMUSP, Orientadora de pós-graduação do Depto. de Psiquiatria da FMUSP, Coordenadora do Programa

Equilíbrio, da Prefeitura de São Paulo e do Instituto de Psiquiatria da FMUSP.

- **Sérgio Colacioppo**

  Professor Associado de Higiene e Toxicologia Ocupacional da Faculdade de Saúde Publica da Universidade de São Paulo e Diretor da Toxikón Higiene Industrial.

- **Silvia Berlanga de Moraes Barros**

  Professora Titular do Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Silvia de Oliveira Santos Cazenave**

  Professora Dra. da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da PUC de Campinas, Professora Titular de Toxicologia, Perita Criminal do Laboratório de Toxicologia do Instituto de Criminalística de Campinas.

- **Silvia Regina Cavani Jorge Santos**

  Professora Titular de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Chefe do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Solange C. Davino**

  Farmacêutica-Bioquímica e Doutora em Farmacologia pela Universidade de São Paulo.

- **Sônia Aparecida Dantas Barcia**

  Farmacêutica Bioquímica pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Farmacêutica Toxicologista do Centro do Controle de Intoxicações de São Paulo.

- **Taís Freire Galvão**

  Farmacêutica-Bioquímica pela Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Coordenadora do Centro de Informações Toxicologicas do Amazonas – CIT/AM, Mestranda do Programa de Saúde baseada em Evidências da Unifesp.

- **Thais Guaratini**

  Doutoranda em Bioquímica no Instituto de Química da USP, Mestre em Fármacos e Medicamentos pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto.

- **Tania Marcourakis**

  Professora Doutora do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

- **Vania Rodríguez**

  Mestre em Toxicologia e Análise Toxicológica pela USP, Doutoranda do Laboratório de Toxinas e Produtos Naturais de Algas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

- **Vera Lucia Lanchote**

  Professora Titular de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP.

- **Virgínia Martins Carvalho**

  Doutoranda em Toxicologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Mestre em Análises Toxicológicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Guarulhos. Professora de Toxicologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica Oswaldo Cruz.

# Prefácio

A terceira edição do Fundamentos de Toxicologia, otimizada e ampliada, foi feita com a mesma atenção e cuidado da primeira edição que deu a Seizi Oga o Prêmio Jabuti de melhor obra do ano de 1997, na área de Ciências Naturais e Medicina.

Para conhecer o livro, é preciso entender o autor, cuja principal motivação é o prazer de ensinar, a prática da didática, em aulas ou livros. Dos livros, vem a recompensa de elogios e agradecimentos de estudantes de todo o Brasil, pela objetividade e clareza que consegue transmitir nos seus textos. Orientou numerosos pós-graduandos, formando discípulos que se espalharam pelo país. Seu esmero no preparo das aulas e dos cursos da Universidade de São Paulo refletiu-se, por seis vezes, pelos seus alunos farmacêuticos, pela sua escolha como paraninfo e patrono.

A didática tem sólido suporte científico: Oga foi pioneiro em pesquisa em farmacocinética e metabolismo (citocromo P-450), desde a década de 1970, no Brasil e no Japão. Inerente ao campo de cinética, nas suas teses e em numerosos estudos publicados, pesquisou a toxicidade e a teratogenicidade de drogas. Por mérito, sua carreira universitária evolui naturalmente até a função de Professor Titular de Toxicologia e, por consenso de seus pares, Diretor da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Mas, apesar dos títulos, meu amigo e parceiro científico Seizi Oga é na didática e no relacionamento com os alunos que mais se empolga.

Fundamentos de Toxicologia, o principal trabalho de Seizi Oga, traz toda a atualização científica necessária à obra, que é dedicada aos estudantes brasileiros dos cursos de farmácia.

São Paulo, janeiro de 2008.

*Antonio Carlos Zanini*

# Prefácio da primeira edição

O risco de intoxicação por agentes químicos e físicos aumenta na proporção direta ao desenvolvimento da ciência e da tecnologia, que coloca à disposição da população um número cada vez maior de produtos, sejam eles alimentos, medicamentos, inseticidas ou derivados domissanitários.

A Toxicologia, uma ciência multidisciplinar, investiga os toxicantes sob vários aspectos, desde sua natureza, métodos de detecção, até os efeitos que causam em seres vivos. Portanto, é indiscutível a sua importância no contexto atual da Saúde Pública.

A disciplina de Toxicologia é ministrada tradicionalmente nos cursos de graduação de Farmácia, dando-se ênfase, em aulas práticas, à metodologia analítica. Na pós-graduação, a Universidade de São Paulo oferece cursos de mestrado, com enfoque voltado às Análises Toxicológicas, e de Doutorado, com orientação mais ampla sobre todos os tópicos da Toxicologia.

O presente livro, que constitui mais uma obra didática da séric Zanini • Oga, foi idealizado por um grupo de professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e tem como objetivo básico contribuir para o ensino da Toxicologia. Assim, os temas pertinentes foram abordados de maneira simples, sucinta e atualizada, e na mesma seqüência em que são ministrados, na maioria das Escolas de Farmácia do Brasil.

Como em todos os trabalhos deste porte, inevitavelmente surgirão, no decorrer de sua leitura, falhas cometidas involuntariamente pelo editor e seus colaboradores. Agradecemos, desde já, aos leitores que nos enviarem críticas e sugestões que contribuam para o aperfeiçoamento das futuras edições.

Somos particularmente gratos aos colegas, especialistas nas diversas áreas da Toxicologia, que colaboraram, em caráter voluntário, desenvolvendo capítulos ou dedicando-se à árdua tarefa da revisão do texto.

São Paulo, abril de 1996.

*Seizi Oga*

# Agradecimentos

A disciplina de Toxicologia, que integra o currículo de graduação do curso de Farmácia, vem exercendo papel de grande importância na formação de farmacêuticos, tendo em vista a crescente exposição da população, no seu dia-a-dia, aos agentes tóxicos de natureza mais diversa. Através do conhecimento de propriedades de diferentes xenobióticos e aplicação de modernas técnicas analíticas, os toxicologistas prestam relevante serviço à saúde pública, auxiliando no diagnóstico e na prevenção de intoxicações.

A Toxicologia é uma ciência e, como tal, evolui rapidamente com o tempo, por vezes, mudando até alguns de seus conceitos básicos e métodos utilizados em suas pesquisas.

Lançamos esta terceira edição, incentivados pelos colegas, tendo como principal objetivo oferecer aos leitores, estudantes e profissionais da área de saúde, uma obra de fácil leitura, contendo achados mais recentes sobre os fundamentos de toxicologia e características de agentes físico-químicos que são nocivos ao sistema biológico.

A maioria dos colaboradores das edições anteriores continua nesta edição, a quem consignamos o nosso especial agradecimento pela sua renovada disposição e espírito de cooperação, revendo e atualizando seus capítulos, em tempo relativamente curto.

Agradecemos também aos novos colaboradores que vêm somar esforços, para o aprimoramento desta obra.

*S. Oga*
*M.M.A. Camargo*
*J.A.O. Batistuzzo*

# Conteúdo


**PARTE 1: BASES DA TOXICOLOGIA**

1.1. Introdução à Toxicologia ..... 1
*Seizi Oga* e *Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira*

1.2. Toxicocinética ..... 9
*Seizi Oga, Sandra Helena P. Farsky* e *Tania Marcourakis*

1.3. Toxicodinâmica ..... 27
*Seizi Oga, Sandra Helena P. Farsky* e *Tania Marcourakis*

1.4. Radicais Livres e Antioxidantes ..... 37
*Dulcineia Saes Parra Abdalla* e *Luciane Aparecida Faine*

1.5. Avaliação da Toxicidade ..... 59
*Silvia Berlanga de M. Barros* e *Solange C. Davino*

1.6. Avaliação do Risco ..... 71
*Cristiana Leslie Corrêa, Herling Gregório A. Alonzo* e *Rosa Maria de Sá Trevisan*

1.7. Mutagênese e Carcinogênese ..... 81
*Gláucia Maria Machado-Santelli e Fábio Siviero*

1.8. Toxicologia da Reprodução ..... 101
*Ione Pellegatti Lemonica*

1.9. Controle Terapêutico ..... 115
*Silvia Regina Cavani Jorge Santos, Vera Lucia Lanchote, Cristina Sanches* e *Karin Jannet Vera López*

**PARTE 2: TOXICOLOGIA AMBIENTAL**

2.1. Ecotoxicologia ..... 125
*Thais Guaratini, Karina Helena Morais Cardozo, David Domingues Pavanelli, Pio Colepicolo* e *Ernani Pinto*

2.2. Poluentes da Atmosfera ..... 143
*Danielle Palma de Oliveira* e *Fabio Kummrow*

2.3. Domissanitários e Plantas Ornamentais ..... 165
*Samuel Schvartsman*

2.4. Materiais Radioativos e Radiação Ionizante ..... 175
*Edmundo Garcia Agudo*

2.5. A Qualidade do Ar nos Ambientes Internos ..... 189
*Maria Helena Roquetti Humaytá* e *Nilda A. G. G. de Fernicola*

2.6. Contaminantes da Água e do Solo ..... 199
*Maria de Fátima Pedrozo* e *Rúbia Kuno*
2.7. Cianobactérias e Microalgas Tóxicas em Ambientes Aquáticos ..... 225
*Paula Kujbida, Vania Rodríguez* e *Ernani Pinto*

**PARTE 3: TOXICOLOGIA OCUPACIONAL**

3.1. Monitoramento Ambiental e Biológico ..... 241
*Henrique V. Della Rosa, Maria Elisa Pereira Bastos Siqueira* e *Sergio Colacioppo*
3.2. Agentes Metemoglobinizantes ..... 261
*José Salvador Lepera*
3.3. Solventes Orgânicos ..... 275
*Edna Maria Alvarez Leite*

**PARTE 4: TOXICOLOGIA SOCIAL E MEDICAMENTOS**

4.1. Fármacos e Drogas que Causam Dependência ..... 325
*Regina Lúcia de Moraes Moreau*
4.2. Opiáceos e Opióides ..... 337
*Georgino Honorato de Oliveira* e *Márcia Maria de Almeida Camargo*
4.3. Estimulantes do Sistema Nervoso Central ..... 353
*Alice A. da Matta Chasin, Erasmo Soares da Silva* e *Virgínia Martins Carvalho*
4.4. Barbitúricos e Benzodiazepínicos ..... 375
*Maria das Graças Almeida* e *Irene Videira de Lima*
4.5. Etanol ..... 389
*Sandra Scivoletto, André Malbergier* e *Adriana Pileggi*
4.6. Inalantes ..... 405
*Maria de Fátima M. Pedroso* e *Maria das Graças Silva de Jesus*
4.7. Tabaco ..... 419
*João Ferreira Galvão, Taís Freire Galvão* e *Regina Lúcia de Moraes Moreau*
4.8. *Cannabis* ..... 433
*Regina Lúcia de Moraes Moreau*
4.9. Alucinógenos ..... 447
*Silvia de Oliveira Santos Cazenave* e *José Luiz da Costa*
4.10. Dopagem no Esporte ..... 465
*Maurício Yonamine* e *Daniela Mendes Louzada de Paula*
4.11. Esteróides Anabólicos Androgênicos ..... 481
*Rosemary Custódio Pedroso*
4.12. Dopagem nos Esportes por Diuréticos ..... 497
*Angélica Yoshiy*

4.13. Dopagem nos Esportes por Cafeína ..... 507
*Rosemary Custódio Pedroso*
4.14. Intoxicações por Medicamentos ..... 521
*Darcileia Alves do Amaral, Edna Maria Miello Hernandez* e *Sônia Aparecida Dantas Barcia*
4.15. Antiinflamatórios ..... 535
*Carlos Alberto Tagliati*
4.16. Análises Toxicológicas de Emergência ..... 553
*Maria Zilda Nunes Carrazza*
4.17. Toxicologia Ocular ..... 563
*José Antonio de Oliveira Batistuzzo, João Brasil Vita Sobrinho* e *Acácio Alves de Souza Lima Filho*
PARTE 5: TOXICOLOGIA DE ALIMENTOS
5.1. Metais em Alimentos ..... 577
*Paulo Eduardo de Toledo Salgado*
5.2. Micotoxinas em Alimentos ..... 609
*Myrna Sabino*
5.3. Praguicidas ..... 621
*Herling Gregório A. Alonzo* e *Cristina Leslie Corrêa*

ÍNDICE ..... 643

# PARTE 1
# Bases da Toxicologia

## 1.1.

# Introdução à Toxicologia

*Seizi Oga* e *Maria Elisa P. B. de Siqueira*

**SUMÁRIO**

1. História
2. Conceitos básicos
3. Relação da Toxicologia com outras ciências
4. Divisão e finalidades da toxicologia
5. Áreas de atuação
6. Bibliografia

## 1. HISTÓRIA

A história da Toxicologia acompanha a própria história da civilização, pois, desde a época mais remota, o homem possuía conhecimento sobre os efeitos tóxicos de venenos animais e de uma variedade de plantas tóxicas. Assim, apesar da falta de registros nos primórdios da humanidade, a Toxicologia é uma das ciências *práticas* mais antigas. O poder aniquilador de venenos era, freqüentemente, utilizado como instrumento de caça ou como arma contra os inimigos.

Um dos documentos mais antigos, o Papiro de *Ebers* (1500 a.C.), de origem egípcia, registra uma lista de cerca de 800 ingredientes ativos, incluindo metais do tipo chumbo e cobre, venenos de animais e diversos vegetais tóxicos. **Hippocrates** (460-364 a.C.), **Theophrastus** (370-287 a.C.), **Dioscorides** (40-90 d.C.), entre outros, contribuíram muito para a identificação de novos agentes tóxicos e terapêuticos.

Na antiguidade, o veneno foi muito utilizado com fins políticos. Provavelmente, o caso mais conhecido do uso de veneno em execuções do estado foi o de Sócrates (470-399 a.C.), condenado à morte pela ingestão de extrato de cicuta.

A primeira classificação de venenos, em animais, vegetais e minerais, se deve a Dioscorides, médico grego que trabalhava na corte do imperador romano Nero. O ópio, a cicuta, o acônito e os *digitalis* estavam entre os agentes tóxicos obtidos do reino vegetal, enquanto os venenos de víboras, sapos e salamandras representavam os agentes do reino animal. Entre as substâncias de origem mineral citavam-se o arsênio, o chumbo, o cobre e o antimônio. Dioscorides recomendava o uso de eméticos em casos de envenenamento e as ventosas nas picadas de cobras.

**Mitridates** (120-63 a.C.), provavelmente, foi o primeiro a realizar experiências toxicológicas. O rei do Ponto, no século II a.C., temendo ser envenenado, testava em seus escravos vários tipos de venenos, na tentativa de encontrar seus antídotos. De seus experimentos resultou o *Mithridaticum*, uma mistura que continha basicamente gordura de víbora e enxofre e utilizada como tônico e poderoso antídoto. O raciocínio que conduzia seus atos era simples: a gordura de víbora, por exemplo, era tida como dotada de ação protetora, uma vez que a víbora era resistente ao seu próprio veneno. O termo mitridático designava o fenômeno de tolerância adquirida. A mistura resistiu ao tempo, com algumas alterações na sua composição e, ainda na Idade Média, era utilizada com o nome de *Theriacum*. **Nicandro** (204-135 a.C.) descreve a ação de muitos venenos em seus dois poemas intitulados *Theric* e *Alexipharmaca* descrevendo sobre a toxicidade de vários venenos e o antidotismo. A raiz do *heléboro* foi citada como agente terapêutico no tratamento da loucura e como veneno de flechas. As plantas pertencentes à família *Solanaceae*, particularmente o estramônio e a beladona, foram designadas *mandrágoras*.

Em Roma, o uso indiscriminado de venenos ganhou proporções epidêmicas durante o século IV a.C. e este uso em larga escala prosseguiu até que Sulla elaborou a *Lex Cornelia* (cerca de 82 a.C.), que parece ter sido a primeira lei para punir os envenenadores.

A Toxicologia evoluiu lentamente e mesmo nos séculos XVII e XVIII os métodos de estudo eram muito empíricos.

**Avicena** (*Abu Ali Husain ibn Abdullah ibn Sina*) (980-1037) deu sua contribuição à Toxicologia, com as discussões sobre mecanismos de ação de venenos, incluindo neurotoxicidade e efeitos metabólicos. Ele recomendava a pedra de bezoar (concreções biliares de bode) como antídoto e preventivo de doenças. A eficácia da pedra de bezoar foi testada por Paré, com a permissão do rei Carlos IX, em um pobre prisioneiro, condenado à morte, que recebeu concomitantemente o bicloreto de mercúrio e o antídoto universal. A vítima acabou morrendo após terrível sofrimento.

As pedras preciosas, igualmente, eram tidas como excelentes antídotos. Às pedras de maior valor era atribuído maior efeito curativo. Assim, a ametista era indicada para intoxicações por bebidas alcoólicas e o topázio na prevenção de morte súbita.

Durante o obscurantismo científico da Idade Média e até os primórdios do Renascimento, os envenenamentos eram aceitos pela sociedade européia como risco "normal" da vida cotidiana. Entretanto, alguns conhecimentos científicos em toxicologia foram gerados pelos árabes. Assim, a medicina árabe desenvolveu métodos químicos – destilação, sublimação e cristalização – para a preparação de extratos medicamentosos, aplicados também aos venenos. Um médico expoente desta época foi **Maimonides** (Moses bem Maimon, 1135-1204) que escreveu um tratado, *Poisons and their Antidotes*, sobre o tratamento de envenenamento por cobras, insetos e cachorros loucos, chamando a atenção para o efeito protetor do leite, manteiga e gorduras, ao retardar a absorção intestinal de venenos.

No início do Renascimento, envenenadores tornaram comum o uso de veneno, na Itália, com finalidade criminal. Nesta época destaca-se madame *Toffana*, que preparava cosméticos a base de arsênio. Na França, a *Marquesa de Brinvillers* foi uma das mais conhecidas envenenadoras, testando suas "receitas", e anotando seus efeitos, eficácia, locais mais atingidos, entre outros. *La Voisine* (Catherine Deshayes), "trabalhava"

como envenenadora, comercializando seus serviços. Luís XIV estabeleceu então uma comissão judicial especial para punir envenenadores, a *Chambre Ardente*, que teve um expressivo papel na diminuição do uso do veneno com finalidade criminal.

Uma figura de grande importância na medicina, assim como na história da ciência, Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim – **Paracelsus** (1493-1541), desenvolveu estudos e idéias, revolucionárias na época, envolvendo a farmacologia, a toxicologia e a terapêutica, sendo que vários princípios permanecem ainda válidos, principalmente seu postulado mais conhecido "todas as substâncias são venenos; não há nenhuma que não seja um veneno. A dose correta diferencia o veneno do remédio". Ainda que a nocividade do trabalho em minas de extração de metais tenha sido descrita antes (Ellenbog, 1480), o trabalho de Paracelsus, publicado em 1567, *On the miner's sickness and other diseases of miners,* foi o estudo mais completo até então realizado em Toxicologia Ocupacional, já citando não apenas a sintomatologia e o tratamento, mas também discorrendo sobre a prevenção de doenças associadas ao trabalho. Estudos nesta área foram posteriormente desenvolvidos por Bernardino **Ramazzini** que em 1700 publicou o livro *Discourse on the diseases of workers,* que marca o início do desenvolvimento da Medicina e Toxicologia Ocupacional.

Estudos realizados com venenos de serpentes por **Fontana** (1720-1805) valeram-lhe o título de fundador da Toxicologia Moderna. Outros cientistas, tais como Magendie, Orfila, Caventou e Bernard contribuíram de forma extraordinária ao progresso da Toxicologia Mecanística, com seus estudos por métodos científicos e sistemáticos.

**Magendie** (1783-1855), médico e fisiologista experimental, demonstrou o funcionamento de nervos espinhais, estudou o fluxo sangüíneo e os fenômenos de deglutição e vômito. Introduziu a estricnina, o iodeto, o brometo e o ópio na medicina. Descreveu os mecanismos de ação da estricnina e da emetina, incluindo a dinâmica de movimento através de membranas. Seu mais famoso discípulo, **Claude Bernard** (1813-1878), iniciou a carreira como assistente de Magendie e com ele estudou a fisiologia normal e patológica. Sua grande contribuição à toxicologia foi a introdução do conceito de toxicidade de substâncias em órgãos-alvo; o estudo do *curare* (veneno de flechas), desenvolvido por Bernard, permitiu o esclarecimento de seu mecanismo de ação sobre a placa terminal de músculos estriados e sua aplicação em pacientes durante a anestesia cirúrgica.

Dando seqüência aos trabalhos de Bernard, **Rognetta** (1800-1857) descreveu os mecanismos de ação de vários agentes tóxicos, especialmente do arsênio.

Igualmente, **Ehrlich** (1854-1915) teve atuação destacada no cenário científico, pela sua dedicação ao estudo dos mecanismos de ação de agentes tóxicos (toxicodinâmica) e de fármacos (farmacodinâmica). Propôs a teoria de que as substâncias ativas teriam no organismo pontos específicos de ataque, ou regiões mais sensíveis dos tecidos, onde ocorreriam as interações químico-biológicas. Ele identificou posteriormente vários receptores e se tornou o fundador da teoria de receptores.

Algumas técnicas analíticas foram introduzidas na Toxicologia por Joseph Jacob **Plenck** (1739-1807), para identificar e quantificar os agentes tóxicos em tecidos, na tentativa de comprovar as causas de envenenamentos. Portanto, da aplicação de método analítico em toxicologia surge a Toxicologia Forense.

A obra escrita por Mathieu **Orfila** (1787-1853), *Traitè de toxicologie*, realça a importância da combinação de Toxicologia Forense, Clínica e Química Analítica. Foi o primeiro toxicologista a usar, sistematicamente, material de autópsia e análise química como prova legal de envenenamentos. Em suas experiências, Orfila administrava doses conhecidas de agentes tóxicos em animais e observava cuidadosamente os efeitos produzidos, examinando, em seguida, os órgãos e efetuando análise dos agentes em diferentes tecidos e fluidos. A observação da variação dos efeitos bem como do nível alcançado nos tecidos, em função da dose, permitiu-lhe concluir que os agentes tóxicos são absorvidos pelo trato gastrintestinal. Suas investigações permitiram ainda relacionar certos sintomas com as lesões específicas causadas em tecidos.

Frederick **Accum** (1769-1838) foi o pioneiro na aplicação da Química Analítica para a detecção de contaminantes em alimentos e preparações farmacêuticas.

O século XX caracterizou-se pelo grande avanço tecnológico no campo da síntese química. Milhares de novos compostos foram sintetizados para diversos fins, tais como farmacêuticos (fármacos, excipientes), alimentares (conservantes, corantes, flavorizantes) e agrícolas (praguicidas, herbicidas). O contato do homem com esses agentes tem provocado inúmeros casos de intoxicação. Em 1937, houve morte de centenas de pacientes tratados com sulfanilamida. A intoxicação foi causada pelo solvente, dietilenoglicol, utilizado na preparação do elixir de sulfanilamida. No final da década de 1950, várias crianças foram vítimas de grave acidente ocorrido pela utilização de talidomida pelas mulheres no período de gestação. A talidomida é potencialmente teratogênica aos fetos, principalmente nos primeiros meses de desenvolvimento.

Após a Segunda Guerra Mundial, a Toxicologia experimentou notável desenvolvimento, principalmente a partir da década de 1960, deixando de ser a ciência envolvida apenas com o aspecto forense. Hoje a ênfase é voltada à avaliação da segurança e risco na utilização de substâncias químicas, como também à aplicação de dados gerados em estudos toxicológicos como base para o controle regulatório de substâncias químicas no alimento, no ambiente, nos locais de trabalho, entre outros. Os estudos da carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, assim como os aspectos preventivos, preditivos e comportamentais de substâncias químicas são alguns exemplos de tópicos da toxicologia contemporânea.

As autoridades governamentais de vários países decidiram tornar obrigatórios os testes de toxicidade de todos os medicamentos, previamente ao seu registro junto aos Órgãos competentes. No Brasil, a Resolução 1/88 do Conselho Nacional de Saúde estabeleceu normas a serem seguidas para os ensaios pré-Clínicos e Clínicos. A obrigatoriedade de ensaios toxicológicos é hoje válida também para as substâncias pertencentes a outras categorias, tipo praguicidas, domissanitários e aditivos alimentares, com as quais o homem entra em contato como usuário ou durante o processo de fabricação; sua regulamentação é feita principalmente pelo Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura e Ibama – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.

Assim, a Toxicologia é hoje uma verdadeira ciência social, cujo estudo visa propor maneiras seguras de se expor às substâncias químicas, permitindo que o homem se beneficie das conquistas da atual era tecnológica.

## 2. CONCEITOS BÁSICOS

A **Toxicologia** é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo, sob condições específicas de exposição. Assim, a Toxicologia é a ciência que investiga experimentalmente a ocorrência, a natureza, a incidência, os mecanismos e os fatores de risco dos efeitos deletérios de agentes químicos. Os efeitos tóxicos variam desde os considerados leves, como a irritação dos olhos, até respostas mais sérias, como o dano hepático ou renal, podendo ser tão graves quanto incapacitação permanente de um órgão, como a cirrose ou o câncer.

De fato, é difícil conceituar **efeito nocivo**, isto é, a partir de que ponto determinado efeito biológico passa a ser considerado *nocivo*. De acordo com a National Academy of Sciences, um efeito é considerado nocivo se:

- ao ser produzido numa exposição prolongada resulte em transtornos da capacidade funcional e/ou da capacidade do organismo em compensar nova sobrecarga;
- diminui perceptivelmente a capacidade do organismo de manter sua homeostasia, quer sejam efeitos reversíveis ou irreversíveis;
- aumenta a suscetibilidade aos efeitos indesejáveis de outros fatores ambientais tais como os químicos, os físicos, os biológicos ou os sociais.

Entende-se por **agente tóxico** ou **toxicante** a entidade química capaz de causar dano a um sistema biológico, alterando seriamente uma função ou levando-o à morte, sob certas condições de exposição. **Veneno** é hoje um termo de uso popular utilizado para designar a substância química, ou mistura de substâncias químicas, que provoca a intoxicação ou a morte com baixas doses, como também reservado, segundo alguns autores, especificamente para designar substâncias provenientes de animais, nos quais teriam importantes funções de autodefesa ou de predação, como é o caso do veneno de cobra, de abelha etc.

O conceito de toxicante envolve um aspecto quantitativo e outro qualitativo. O toxicante no aspecto quantitativo significa que praticamente toda substância, perigosa em certas doses, pode ser desprovida de perigo em doses muito baixas. Como, por exemplo, o cloreto de vinila, que é um potente hepatotóxico em doses elevadas, é um carcinógeno em exposição prolongada a baixas doses e, aparentemente, desprovido de efeito nocivo em doses muito baixas. No aspecto qualitativo, pode-se considerar que uma substância nociva para uma espécie ou linhagem, pode ser desprovida de perigo para outra espécie, como por exemplo, o tetracloreto de carbono, altamente hepatotóxico para várias espécies, incluindo o homem, é relativamente seguro para frangos. Outras condições da exposição ao xenobiótico também interferem no aparecimento ou não do efeito nocivo, como a via de introdução, a duração e a freqüência da exposição, entre outras.

**Droga** é toda substância capaz de modificar ou explorar o sistema fisiológico ou estado patológico, utilizada com ou sem intenção de benefício do organismo receptor. Difere do **fármaco**, pois este é definido como sendo toda substância de estrutura química definida, capaz de modificar ou explorar o sistema fisiológico ou estado patológico, em benefício do organismo receptor. Assim, a *Cannabis sativa* (maconha) seria uma droga e o seu principal constituinte psicoativo, o $^{9}\Delta$ – tetraidrocanabinol, um fármaco. Entretanto, a palavra droga tem aceitação popular para designar fármacos, medicamentos, matéria-prima de medicamentos e toxicantes.

**Antídoto** é um agente capaz de antagonizar os efeitos tóxicos de substâncias.

A propriedade de agentes tóxicos de promoverem injúrias às estruturas biológicas, por meio de interações físico-químicas, é chamada **toxicidade**. Portanto, a toxicidade é a capacidade inerente e potencial do agente tóxico de provocar efeitos nocivos em organismos vivos. A toxicidade raramente pode ser definida como um evento molecular único; preferentemente, envolve uma cascata de eventos que se iniciam com a exposição, seguida de distribuição e biotransformação e terminando em interações com macromoléculas (como o DNA ou proteínas) e a expressão de um *end point* para o efeito nocivo. Esta seqüência pode ser atenuada pela excreção e reparo. A medida da toxicidade é complexa, pode ser aguda ou crônica, e variar de um órgão para outro, assim também com a idade, genética, gênero, dieta, condição fisiológica ou estado de saúde do organismo. O fator mais importante na toxicidade maior ou menor de uma substância química, em humanos, é a variação genética, em oposto aos animais de experimentação, em que este fator pode ser controlado. Assim, a medida simples da DL50 é altamente dependente do controle rigoroso das variáveis. Como resultado, os valores da DL50 variam marcadamente de um laboratório para outro.

**Ação tóxica** é a maneira pela qual um agente tóxico exerce sua atividade sobre as estruturas teciduais. Toxicidade deve ser diferenciada de *risco*, termo que traduz a probabilidade estatística de uma substância química provocar efeitos nocivos em condições definidas de exposição. Assim, uma substância pode apresentar elevada toxicidade (avaliada pelo teste da DL50) e baixo risco, isto é, baixa probabilidade de causar intoxicações nas condições em que é utilizada.

A **intoxicação** é a manifestação dos efeitos tóxicos. É um processo patológico causado por substâncias químicas endógenas ou exógenas e caracterizado por desequilíbrio fisiológico, em conseqüência das alterações bioquímicas no organismo. Esse processo é evidenciado por sinais e sintomas ou mediante exames laboratoriais.

**Xenobiótico** é o termo usado para designar substâncias químicas estranhas ao organismo. Agentes poluentes da atmosfera e metais do tipo chumbo e mercúrio são xenobióticos, desde que não possuam papel fisiológico conhecido. Em Toxicologia também é considerado xenobiótico a substância química estranha *quantitativamente* ao organismo, como por exemplo, o manganês, elemento normalmente presente e necessário ao organismo, que em condições de exposição elevada pode provocar intoxicação grave, às vezes irreversível, em trabalhadores.

Dependendo das condições de exposição, toda substância pode agir como toxicante, causando efeito nocivo ao ser vivo. Inclusive, todos os medicamentos possuem, em menor ou maior grau, propriedades tóxicas, provocando efeitos adversos, sendo a dose um dos fatores preponderantes que determinam a intoxicação. À medida que aumenta a dose, os efeitos adversos dos medicamentos se acentuam.

Os complexos eventos envolvidos na intoxicação, desde a exposição do organismo ao toxicante até o aparecimento de sinais e sintomas, podem ser desdobrados, para fins didáticos, em quatro fases, ditas fases de intoxicação.

a) **Fase de exposição.** É a fase em que as superfícies externa ou interna do organismo entram em contato com o toxicante. É importante considerar, nesta fase, a dose ou a concentração do xenobiótico, a via de introdução, a freqüência e a duração da exposição, as propriedades físico-químicas das substâncias, assim como a susceptibilidade individual. Todos estes fatores condicionam a *disponibilidade química* do xenobiótico, ou seja, a fração do mesmo disponível para a absorção.

b) **Fase toxicocinética.** Inclui todos os processos envolvidos na relação entre a absorção e a concentração do agente tóxico nos diferentes tecidos do organismo, através dos deslocamentos da substância no organismo. Intervêm nesta fase absorção, distribuição, armazenamento, biotransformação e os processos de excreção de substâncias químicas. As propriedades físico-químicas dos toxicantes determinam o grau de acesso aos órgãos-alvo, assim como a velocidade de sua eliminação do organismo. O balanço destes movimentos é que condiciona a *biodisponibilidade* da substância.

c) **Fase toxicodinâmica.** Compreende a interação entre as moléculas do toxicante e os sítios de ação, específicos ou não, dos órgãos e, conseqüentemente, o aparecimento de desequilíbrio homeostásico.

d) **Fase clínica.** É a fase em que há evidências de sinais e sintomas, ou ainda alterações patológicas detectáveis mediante provas diagnósticas, caracterizando os efeitos nocivos provocados pela interação do toxicante com o organismo.

A toxicologia visa, além de avaliar as lesões causadas no organismo por toxicantes, investigar os mecanismos envolvidos no processo. Procura também identificar e quantificar as substâncias tóxicas

presentes nos fluidos biológicos e determinar seus níveis toleráveis no organismo. Esses conhecimentos, sem dúvida, são de fundamental importância na instituição de uma terapêutica segura de pacientes intoxicados e no estabelecimento de medidas que possam prevenir as intoxicações. O estudo dos mecanismos de ação tóxica é desenvolvido através de ensaios biológicos, utilizando diversas espécies animais e diferentes modelos experimentais.

## 3. RELAÇÃO DA TOXICOLOGIA COM OUTRAS CIÊNCIAS

A Toxicologia é uma ciência muito eclética e contribui significativamente para o desenvolvimento de outras ciências e atividades humanas diversas. Por um lado, ela necessita conhecimentos, métodos e conceitos filosóficos de algumas ciências para sua atuação, como da química, bioquímica, patologia, fisiologia, epidemiologia, imunologia, ecologia, biofísica e, mais recentemente, da biologia molecular.

A sua contribuição é decisiva para o desenvolvimento das ciências, como a medicina forense, a toxicologia clínica, a farmácia, a farmacologia, saúde pública e higiene industrial. Também contribui para a medicina veterinária e alguns aspectos importantes da agricultura, como no desenvolvimento e uso seguro de praguicidas. Nos anos mais recentes, sua contribuição para as ciências ambientais vem ganhando importância.

Métodos toxicológicos, tanto de análise dos agentes quanto de avaliação das lesões causadas em seres vivos, servem de importantes subsídios para a Farmacologia, que estuda especificamente os agentes terapêuticos e diagnósticos. Reciprocamente, os métodos farmacológicos são de utilidade na elucidação dos mecanismos de ação de agentes tóxicos. Portanto, há uma estreita relação entre a Toxicologia e a Farmacologia e muitas das áreas de atuação são comuns às duas especialidades.

## 4. DIVISÃO E FINALIDADES DA TOXICOLOGIA

A Toxicologia abrange uma vasta área de conhecimentos, na qual atuam profissionais de diversas formações. Ela pode ser dividida, de acordo com os diferentes campos de trabalho, em **Toxicologia Analítica** ou **Química, Toxicologia Clínica** ou **Médica** e **Toxicologia Experimental.**

A **Toxicologia Analítica** trata da detecção do agente químico ou de algum outro parâmetro relacionado à exposição ao toxicante, em substratos tais como fluidos orgânicos, alimentos, água, ar, solo, entre outros, com o objetivo precípuo de ***prevenir*** ou ***diagnosticar as intoxicações***. A toxicologia analítica busca métodos exatos, precisos, de sensibilidade adequada para a identificação inequívoca do toxicante, ou para observar alterações bioquímicas funcionais do organismo. O domínio de química analítica e de instrumentação é de fundamental importância no exercício dessa modalidade.

No ***aspecto forense***, as análises toxicológicas são usadas na detecção e identificação de agentes tóxicos para fins médico-legais em material biológico ou em materiais diversos como água, alimentos, medicamentos, drogas comercializadas no mercado ilícito, entre outras, envolvidas em ocorrências policiais/legais.

A toxicologia analítica é também importante no ***monitoramento terapêutico***, ou acompanhamento de pacientes submetidos ao tratamento prolongado com alguns tipos de medicamentos, especialmente os de baixo índice terapêutico, mediante determinação sistemática ou periódica do fármaco em material biológico, notadamente em plasma. A monitorização visa efetuar correção de doses, se necessário, durante a farmacoterapia, para obtenção de eficácia terapêutica com ausência, ou baixo risco, de intoxicação. O ***monitoramento biológico*** da exposição ocupacional às substâncias químicas é também aplicação das análises toxicológicas na detecção de toxicante, seus metabólitos ou qualquer alteração de parâmetros bioquímicos, em material biológico proveniente de indivíduos expostos ocupacionalmente, objetivando a prevenção de intoxicações. Outra aplicação de importância é no ***controle antidopagem*** em competições esportivas, em que, mediante métodos analíticos apropriados, investiga-se a presença de substâncias, cujo uso é vedado pela legislação esportiva. O ***diagnóstico laboratorial da intoxicação, aguda ou crônica***, representa uma importante ferramenta para o médico que atende o paciente, auxiliando-o na escolha do melhor tratamento como também no acompanhamento do paciente intoxicado. Exames toxicológicos que visam o ***controle da farmacodependência*** devida ao uso de drogas psicoativas, ilícitas ou não vêm crescendo acentuadamente nos últimos anos, constituindo outra importante aplicação das análises toxicológicas. Análises em outros substratos como a água, alimentos, ar, solo, entre outros, também são designadas de toxicológicas, desde que a finalidade seja a prevenção ou o diagnóstico de intoxicações.

O atendimento do paciente exposto ao toxicante ou do intoxicado, para prevenir ou diagnosticar a intoxicação e aplicar-lhe uma terapêutica específica, é da competência dos profissionais que se dedicam à **Toxicologia Clínica ou Médica**. Os toxicologistas analíticos, juntamente com o corpo clínico, desempenham relevante papel no diagnóstico das intoxicações e na identificação dos agentes tóxicos, por meio de análises laboratoriais, clínicas e toxicológicas.

A **Toxicologia Experimental** desenvolve estudos para a elucidação dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre o sistema biológico e para avaliação dos efeitos decorrentes dessa ação. A avaliação da toxicidade de substâncias é feita, utilizando diferentes espécies animais, seguindo as rigorosas normas preconizadas pelos Órgãos Reguladores do país. O estudo dos efeitos nocivos causados por certos agentes do tipo praguicidas e herbicidas ao meio ambiente constitui uma modalidade da Toxicologia, a **Ecotoxicologia.** As agressões ecológicas por agentes tóxicos são avaliadas, testando-os em algas, bactérias, dáfnias, abelhas, minhocas, peixes e outras espécies que integram a fauna e a flora de cada localidade.

As **finalidades** do estudo da Toxicologia, qualquer que seja o ramo considerado, são o *diagnóstico*, o *tratamento* e, principalmente, a *prevenção* das intoxicações. O **objeto de estudo** desta ciência é a intoxicação.

## 5. ÁREAS DE ATUAÇÃO

No âmbito da Toxicologia, distinguem-se várias áreas de atuação de acordo com a natureza do agente ou a maneira como este atinge o sistema biológico. Destacam-se, entre outras, as áreas de Toxicologia Ambiental, Ocupacional, de Alimentos, de Medicamentos e Cosméticos e Social.

A **Toxicologia Ambiental** é a área da Toxicologia em que se estuda os efeitos nocivos causados pela interação de agentes químicos contaminantes do ambiente – água, solo, ar – com os organismos humanos.

A **Toxicologia Ocupacional** dedica-se ao estudo dos efeitos nocivos produzidos pela interação dos agentes químicos presentes no ambiente *de trabalho* com os indivíduos a eles expostos.

A **Toxicologia de Alimentos** estuda os efeitos nocivos provocados por substâncias químicas presentes em alimentos, para definir as condições em que os alimentos podem ser ingeridos sem causar danos ao organismo.

A **Toxicologia de Medicamentos** e **Cosméticos** é a área em que se estudam os efeitos nocivos produzidos pela interação de medicamentos ou cosméticos com o organismo, decorrentes de uso inadequado ou da suscetibilidade individual.

A **Toxicologia Social** estuda os efeitos nocivos decorrentes do uso não médico de drogas ou fármacos, causando prejuízo ao próprio indivíduo e à sociedade.

Em cada uma dessas áreas, vários aspectos da Toxicologia podem ser abordados como, por exemplo, forense ou legal, pediátrico, econômico, regulatório e mecanístico, descritivo, entre outros.

A Toxicologia é uma ciência proeminentemente aplicada e que objetiva melhorar a qualidade de vida e a saúde do ambiente, sendo uma ciência de inegável importância social no mundo contemporâneo. Seu campo de atuação expandiu enormemente nas últimas décadas, tornando-se uma ciência cujos conhecimentos são importantes para a tomada de decisões relativas à regulamentação de substâncias químicas que contribuem para garantir a sobrevivência do homem e do planeta. Seu conhecimento é indispensável ao trabalho dos profissionais que se dedicam tanto às áreas de ciências biológicas quanto às de exatas e humanas.

Em face da complexidade e da amplitude do campo da Toxicologia, faz-se sempre necessário um trabalho conjunto de profissionais com diferentes formações básicas na resolução de problemas que envolvam substâncias tóxicas.

## 6. BIBLIOGRAFIA


ARIENS, E.J.; SIMONIS, A.M.; OFFERMEIER, J. *Introductions to General Toxicology*. New York: Academic Press, 1976. p. 13-19.

CASTRO, J.A. Toxicologia Básica. Mecanismos de Toxicidad y Sus Aplicaciones. *Acta Bioq. Clin. Latinoamericana*, v.2, 1993. p.197-206.

CHARBERLANI, J. *Analysis of Drugs in Biological Fluids*. Florida: CRC Press, 1987. 219p.

FERNÍCOLA, N.A.G.; JANGE, P. *Nociones Basicas de Toxicologia*. Metepec: ECO/OPS, 1985. p.3-7.

HODGSON, E. Introduction to Toxicology. In: HODGSON, E. *A Textbook of Modern Toxicology*. 3.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004. p 3-9.

JAMES, R.C.; ROBERTS, S.M.; WILLIAMS, P.L. General principles of toxicology. In: WILLIAMS, P.L.; JAMES, R.C.; ROBERTS, S.M. *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. 2.ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2000. p.18-48 (606 p).

KENAKIN, T. *Pharmacologic Analysis of Drup-Receptor Interaction*. 2.ed. New York: Raven, 1993. 483p.

KLAASEN, C. D. *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. 6.ed. New York: McGraw Hill, 2001. p. 3-10.

MORAES, E.C.F.; SZNELWAR, R.B.; FERNÍCOLA, N.A.G.G. *Manual de Toxicologia Analítica*. São Paulo: Ed. Roca, 1991.

TIMBRELL, J.A. *Introduction to Toxicology*. 2.ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 1999. p.1-5.

VALLE, L.B.S.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; DE LUCIA, R.; OGA, S. *Farmacologia Integrada*. v.1 Princípios Básicos. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1v, 1988. 463p.

VEGA, P.V.; FLORENTINO, M.C.B.L. *Toxicologia de Alimentos*. Instituto Nacional de Salud Publica: México, 2000. p.1-5.

ZANINI, A.C.; OGA, S. *Farmacologia Aplicada*. 5.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1994. 739p.

ZBINDEN, G. *Progress in Toxicology*. v.2. New York: Springer-Verlag, 1976. 117p.

# 1.2.

# Toxicocinética

*Seizi Oga, Sandra Helena P. Farsky* e *Tania Marcourakis*

**SUMÁRIO**

1. Introdução
2. Mecanismo de transporte através de membranas
3. Absorção
   3.1. Absorção dérmica
   3.2. Absorção pela via respiratória
   3.3. Absorção oral
   3.4. Absorção por outras vias
4. Distribuição
   4.1. Volume de distribuição
   4.2. Ligação de agentes tóxicos às proteínas
   4.3. Barreiras biológicas
5. Biotransformação
   5.1. Tipos de reações
      5.1.1. Reações de fase I
      5.1.2. Reações de fase II
      5.1.3. Reações extra-hepáticas
   5.2. Fatores que modificam a biotransformação
      5.2.1. Fatores internos
      5.2.2. Fatores externos
6. Excreção
   6.1. Excreção renal
   6.2. Excreção pelo trato digestivo
   6.3. Excreção pelos pulmões
   6.4. Excreção por outras vias
7. Parâmetros biológicos indicadores da eliminação
8. Bibliografia

## 1. INTRODUÇÃO

A toxicocinética é o estudo da relação entre a quantidade de um agente tóxico que atua sobre o organismo e a concentração dele no plasma, relacionando os processos de absorção, distribuição e eliminação do agente, em função do tempo (Figura 1).

O efeito tóxico é geralmente proporcional à concentração do agente no sítio molecular de ação, denominado também tecido-alvo. A rigor, o conhecimento da concentração do toxicante no sítio de ação permite avaliar melhor o dano ali causado. Entretanto, em face da dificuldade de sua determinação, na prática, mede-se a concentração do agente tóxico no sangue, predominantemente no plasma, que constitui o tecido acessível e em constante comunicação com os tecidos-alvo.

Da mesma maneira que a farmacocinética, a toxicocinética permite, com seus parâmetros, avaliar matematicamente os movimentos dos agentes tóxicos no organismo. Um dos fatores importantes para determinações matemáticas é a capacidade das substâncias de atravessar as membranas plasmáticas.

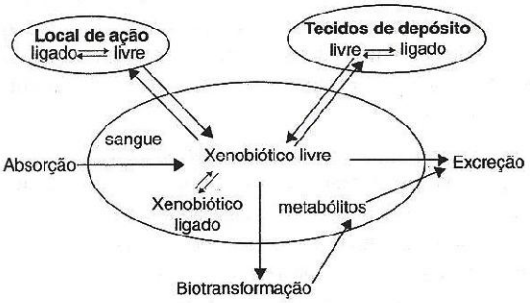



**Figura 1.** Esquema relacionando as fases da toxicocinética.

## 2. MECANISMOS DE TRANSPORTE ATRAVÉS DE MEMBRANAS

As membranas celulares geralmente têm a espessura variável de 7 a 9 nm e são constituídas de dupla camada de fosfolipídios com grupos polares (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina) voltados para as faces externas e ácidos graxos enfileirados perpendicularmente, voltados para o espaço interno. Em microscopia eletrônica observam-se, de espaço em espaço, moléculas de proteínas inseridas nas bi-camadas de lipídios e por vezes atravessando as membranas. As moléculas de proteínas são flexíveis e permitem a formação de espaços, que são preenchidos com água e formam os poros. Desta forma, a hidratação do tecido é fator determinante para a absorção.

Os xenobióticos atravessam as membranas por diferentes mecanismos, dependendo de suas propriedades físico-químicas.

*Transporte passivo.* Transporte passivo é o mecanismo dependente do gradiente de concentração e das características físico-químicas dos agentes químicos. Este processo compreende a filtração, que é a passagem de moléculas polares, hidrossolúveis, pelos poros aquosos da membrana, e a difusão lipídica, que é a passagem de moléculas hidrofóbicas, geralmente maiores que 600 daltons, por difusão através de membranas. Os eletrólitos fracos, representados pelas substâncias de natureza ácida ou alcalina, possuem na sua forma ionizada pouca afinidade a lipídios, impossibilitando assim a sua passagem por difusão lipídica. Somente a sua forma não ionizada consegue transpor as membranas. Neste caso, o coeficiente de dissociação (pKa) e o pH do meio irão determinar maior ou menor ionização, segundo equação de Henderson-Hasselbach.

*Para ácidos:*

$$pKa - pH = \log \frac{[\text{moléculas}]}{[\text{íons}]}$$

*Para bases:*

$$pH - pKa = \log \frac{[\text{moléculas}]}{[\text{íons}]}$$

Portanto, as substâncias de natureza ácida atravessam as membranas muito mais facilmente em pH ácido, enquanto as de natureza alcalina encontrarão melhor condição em pH alcalino.

*Transporte ativo.* Este processo é caracterizado por consumo de energia, movimento de substâncias contra gradiente de concentração e a existência de proteínas carregadoras de moléculas, as quais apresentam seletividade perante as substâncias, podendo ser saturáveis. Recentemente, foi identificada uma série de proteínas agrupadas em famílias de transportadores de acordo com suas estruturas químicas, expressas nas membranas celulares. A expressão destas proteínas tem conferido proteção ou toxicidade dependendo de sua localização e do agente envolvido. A primeira família identificada foi a MDR – Multidrug Resistant Proteins ou glicoproteína P, e assim denominada por determinar resistência a quimioterápicos. Foi verificado prejuízo na absorção intestinal e nas células tumorais, uma vez que estas proteínas transportam o agente químico absorvido novamente para o meio extracelular. Atualmente, sabe-se que, suas expressões geneticamente definidas em células intestinais, renais, hepáticas, endotélio cerebral e placenta, podem determinar toxici-

dade, ou ineficácia ao tratamento. Vale ressaltar que suas expressões variam entre espécies e indivíduos. A super-expressão de transportadores de fármacos na barreira hematoencefálica pode ser um dos mecanismos que explicam a resistência ao tratamento antiepiléptico em alguns pacientes.

*Pinocitose.* É um processo especial de passagem de partículas líquidas através de células, por mecanismo semelhante à fagocitose, que é a ingestão de partículas sólidas por células especiais. A fagocitose por macrófagos é o mecanismo de remoção de material particulado dos alvéolos.

*Difusão facilitada.* Neste processo, a substância é transportada por carregador, sem contudo haver consumo de energia. Diferente do processo de transporte ativo, aqui a passagem através de membranas se faz a favor do gradiente de concentração. A glicose é transportada por esse processo aos diferentes compartimentos teciduais.

## 3. ABSORÇÃO

Absorção é a passagem de substâncias do local de contato para a circulação sangüínea.

As principais vias de exposição de agentes tóxicos no organismo são a dérmica, a oral e a respiratória. Outras vias, tais como a intramuscular, a intravenosa e a subcutânea constituem meios normais de introdução de agentes medicamentosos que, dependendo da dose e das condições fisiológicas ou de doença do paciente, podem produzir efeitos adversos acentuados, com lesões graves em diversos órgãos.

### 3.1. Absorção dérmica

A pele é um órgão formado por múltiplas camadas de tecidos, contribuindo com cerca de 10% de peso corpóreo. A camada mais externa, a epiderme, contém o estrato córneo que é a barreira limitante da absorção. A camada mais interna é a derme, composta de tecido gorduroso, conjuntivo, irrigado por capilares e vasos sangüíneos e onde estão inseridos os folículos pilosos e as glândulas sudoríparas. A pele é relativamente impermeável à maioria dos íons, bem como às soluções aquosas; entretanto, é permeável a grande número de toxicantes sólidos, gases e líquidos lipossolúveis.

Algumas substâncias atuam diretamente sobre a pele, causando efeitos deletérios na epiderme, como corrosão, sensibilização e até mesmo mutações gênicas. Ácidos, bases e certos sais e oxidantes são exemplos de substâncias que comumente causam efeitos locais. A atividade desses agentes pode se restringir aos tecidos de contato ou estender-se aos tecidos mais profundos da derme, promovendo efeitos sistêmicos.

Os efeitos sistêmicos resultam da atuação de toxicantes sobre as células ou tecidos distantes do local de acesso, após sua absorção e distribuição pelo organismo. As substâncias de elevado coeficiente de partição óleo/água são absorvidas com maior facilidade por difusão lipídica, através do estrato córneo. Em menor escala, passam pelos folículos pilosos e canais de glândulas sudoríparas.

### 3.2. Absorção pela via respiratória

A via respiratória é uma via de entrada importante de substâncias tóxicas para o organismo; as partículas sólidas ou líquidas suspensas no ar atmosférico, assim como gases e substâncias voláteis, passam pelas fossas nasais, faringe, laringe, brônquios, traquéia e alvéolos pulmonares, alcançando a circulação sangüínea sistêmica.

As partículas suspensas no ar, com diâmetro menor do que 1 μm, podem chegar até aos alvéolos pulmonares, juntamente com o ar inspirado onde são absorvidas ou removidas pela linfa, pela fagocitose por macrófagos alveolares ou pela aspiração para o muco dos alvéolos da região traqueobronquial. Nesta localização são transportadas para boca e podem ser aspiradas.

As partículas de 2 a 5 μm, geralmente, depositam-se na região traqueobronquiolar e, em seguida, são transportadas pelos mecanismos semelhantes aos descritos acima. As partículas maiores que 5 μm tendem a ser retidas na região nasofaríngea e posteriormente são removidas por processos mecânicos de limpeza do nariz ou espirro. Os efeitos tóxicos mais comumente observados são inflamação e irritação das vias aéreas superiores (Tabela 1).

**Tabela 1.** Absorção de material particulado pela via respiratória.

| Tamanho das partículas | Retenção | Destino |
|---|---|---|
| < 1 μm | Alvéolos pulmonares | Absorção sistêmica<br>Absorção pelo sistema linfático<br>Fagocitose por macrófagos<br>Remoção com o muco, por meio de movimentos ciliares |
| 2-5 μm | Traqueobronquiolar | Remoção com o muco, por meio de movimentos ciliares<br>Fagocitose por macrófagos |
| > 5 μm | Nasofaríngea | Eliminação por assopro, espirro ou limpeza |

A absorção de gases e substâncias voláteis depende basicamente de sua solubilidade no sangue e ocorre principalmente nos pulmões. Vapores ou gases hidrossolúveis, quando inalados, são retidos parcialmente pela mucosa nasal, a qual é coberta por uma fina camada de fluido. À medida que as moléculas de gases atingem os alvéolos, se difundem para o sangue, onde são dissolvidas e assim distribuídas para os tecidos. Instala-se, após algum tempo, um equilíbrio dinâmico entre as moléculas contidas no ar inspirado e as dissolvidas no sangue. O equilíbrio é estabelecido rapidamente com as substâncias pouco solúveis e lentamente com as substâncias altamente solúveis. Nesse momento, é constante a relação da concentração do gás no sangue e no ar. A relação de solubilidade nos dois meios é denominada coeficiente de partição sangue/ar e é constante para cada gás.

No estado de equilíbrio, a passagem de gás do espaço alveolar para o sangue é igual a quantidade de sua liberação do sangue para o espaço alveolar. Substâncias de alto coeficiente de partição sangue/ar, como clorofórmio (15), passam facilmente do ar para o sangue, ao passo que substâncias de baixo coeficiente de partição, como etileno (0,14), somente pequena quantidade é difundida para o sangue, em virtude de sua rápida saturação.

A estimulação da circulação sangüínca c aumento da perfusão pulmonar favorecem principalmente a absorção de gases de baixo coeficiente de partição sangue/ar e pouco influi na absorção de gases de alto coeficiente de partição. No entanto, o aumento da freqüência respiratória acentua predominantemente a absorção de gases de alto coeficiente de partição sangue/ar. Portanto, o fator limitante da absorção de gases e vapores de baixo coeficiente de partição sangue/ar é a circulação, e o de gases ou vapores de alto coeficiente de partição sangue/ar é a respiração (Tabela 2).

**Tabela 2.** Fatores limitantes de absorção de gases e vapores por via respiratória.

| Substância | Coeficiente de partição sangue/ar | Tempo de equilíbrio (min) | Fator limitante |
|---|---|---|---|
| Clorofórmio | 15 | superior a 60 | respiração |
| Etileno | 0,14 | 8 a 21 | circulação |

## 3.3. Absorção oral

Outra via importante de exposição aos toxicantes é o trato digestivo. A ingestão pode ser acidental, por meio de água ou alimentos contaminados, ou voluntária, no ato suicida ou na ingestão de drogas por indivíduos dependentes. A via oral é também a principal via de administração de medicamentos, muitos dos quais são responsáveis pelos efeitos adversos ao organismo. A absorção pode ocorrer tanto no estômago como no intestino. A absorção em cada compartimento é dependente da variação de pH, irrigação e características anatômicas, bem como das propriedades físico-químicas do agente tóxico. Desta forma, um dos fatores que favorecem a absorção de nutrientes e xenobióticos no intestino é a presença de microvilosidades altamente irrigadas, que proporciona grande área de superfície.

A barreira no processo de absorção de substâncias é formada pela mucosa do trato digestivo e pelos epitélios capilares. Daí a facilidade de absorção de substâncias lipofílicas por difusão passiva. De modo geral, os compostos com elevado coeficiente de partição óleo/água são facilmente absorvidos, enquanto substâncias altamente polares são pouco absorvidas. O curare, um composto de amônio quaternário, não é absorvido pelo trato digestivo, daí a explicação porque as caças, abatidas com flecha contaminada pelo curare, não intoxicam as pessoas que se alimentam de suas carnes.

O pH e o pKa são importantes, particularmente para absorção de eletrólitos fracos. Tomando-se como exemplo o ácido benzóico, um ácido de pKa igual a 4, e a anilina de natureza básica de pKa igual a 5, o grau de ionização é variável conforme o pH do meio. O ácido benzóico ioniza-se intensamente conforme aumenta o pH, enquanto a anilina ioniza-se mais em pH ácido. Sendo as moléculas não ionizadas fáceis de serem absorvidas por difusão, o ácido benzóico é mais absorvido em meio ácido e a anilina em meio alcalino (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito do pH e o grau de ionização do ácido benzóico e da anilina.

| pH | Porção não ionizada (%) | |
|---|---|---|
| | ácido benzóico (pKa = 4) | anilina (pKa = 5) |
| 2 | 99,0 | 0,1 |
| 3 | 90,0 | 1,0 |
| 5 | 10,0 | 50,0 |
| 7 | 0,1 | 99,0 |

Outra particularidade da absorção pelo trato digestivo é a possibilidade da ocorrência do ciclo entero-hepático, que consiste na reabsorção de uma substância já excretada; isso acontece, por exemplo, com as substâncias excretadas pela bile, na forma conjugada que, em contato com microrganismos intestinais, é degradada, voltando novamente à forma absorvível.

Além do transporte passivo, as células do sistema gastrintestinal expressam carregadores responsáveis

pela absorção de uma série de agentes químicos, entre os quais metais essenciais. Por exemplo, a absorção do ferro compreende duas etapas: na primeira, o ferro entra nas células da mucosa, onde se liga à proteína e se deposita na forma complexada denominada *ferritina*; na segunda, a *ferritina* libera lentamente o ferro para o sangue, à medida que a sua concentração plasmática é reduzida. O cálcio é absorvido também em duas etapas, de forma semelhante à do ferro, necessitando da ação de vitamina D no seu transporte. Vários metais interferem, entre si, no mecanismo de sua absorção. Assim, o cádmio reduz a absorção do zinco e cobre; o zinco reduz a do cobre, do cálcio e do cádmio.

É importante ressaltar que, por esta via, a absorção é dependente da composição alimentar. O leite pode alterar a absorção de certos metais, contrariamente ao que se prega popularmente, ele aumenta a absorção do chumbo. Na vigência de tratamento com quelante, como o EDTA, a absorção de chumbo e de outros metais pode ser facilitada pela formação de complexos mais lipossolúveis. A presença de alimentos pode alterar o tempo de esvaziamento gástrico e a motilidade gastrintestinal influenciando também a velocidade e a quantidade de absorção de xenobióticos. Ademais, a absorção de xenobióticos e fármacos é reduzida sob ação de uma glicoproteína transmembrânica denominada glicoproteína P (gpP). Essa glicoproteína funciona como bomba de efluxo, dependente de ATP, na transferência de substâncias e metabólitos endógenos para fora das células.

### 3.4. Absorção por outras vias

Entre outras vias de exposição, tem-se, de importância prática, a parenteral (intramuscular, intravenosa, subcutânea), utilizada na terapêutica e pelos dependentes de drogas do tipo cocaína e heroína. Em testes biológicos de xenobióticos em animais, usam-se com freqüência as vias intraperitoneal e subcutânea, que permitem rápida absorção de substâncias.

## 4. DISTRIBUIÇÃO

Os xenobióticos são transportados pelo sangue e pela linfa para os diversos tecidos. Portanto, a distribuição depende do fluxo sangüíneo e linfático nos diferentes órgãos, além, de sofrer interferência de outros fatores tais como ligação às proteínas plasmáticas, diferenças regionais de pH e coeficiente de partição óleo/água de cada substância. O equilíbrio de distribuição é atingido mais facilmente nos tecidos que recebem grande circulação dos fluidos (coração, cérebro, fígado) e mais lentamente nos órgãos pouco irrigados (ossos, unhas, dentes e tecido adiposo).

As partículas ou moléculas de substâncias tóxicas passam do leito vascular para os espaços extracelulares, dispersando-se no fluido intersticial e devem atravessar as membranas celulares para alcançar o fluído intracelular. A intensidade e a duração do efeito tóxico dependem da concentração do agente nos sítios de ação. Para alcançar o sítio de ação, a substância deve estar preferencialmente no seu estado molecular lipossolúvel e não ligada às proteínas plasmáticas (Figura 2).

Na fase inicial da distribuição, os órgãos altamente irrigados recebem grande quantidade de xenobióticos, mas, após algum tempo, órgãos menos irrigados podem acumular maior quantidade do agente, desde que possuam maior afinidade ou maior poder de retenção do que os órgãos intensamente irrigados. Estes são chamados de tecidos de depósito. É o caso, por exemplo, do chumbo que, 2 h após sua administração em animais, 50% da dose encontram-se no fígado; aos 30 dias, 90% do metal que permanece no organismo estão ligados ao tecido ósseo. Este é liberado continuamente à medida que a concentração plasmática diminui. No caso especificamente do chumbo, a intoxicação pode permanecer por muitos anos, uma vez que sua meia-vida de eliminação é de cerca de 20 a 30 anos. Agentes lipofílicos, como alguns anestésicos e pesticidas, acumulam-se no tecido adiposo e em caso de mobilização rápida de gordura, suas concentrações aumentam e podem ser determinantes para a toxicidade.

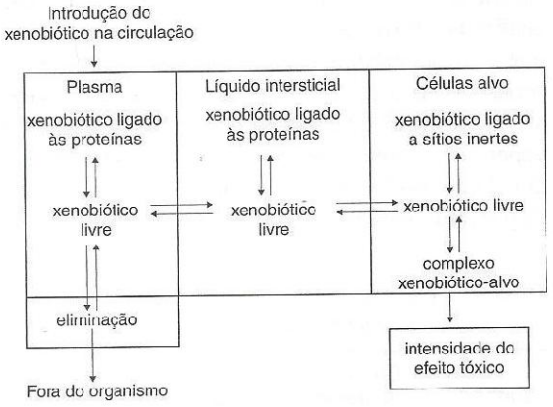



**Figura 2.** Esquema da distribuição de um xenobiótico até seu local de ação.

### 4.1. Volume de distribuição

É o parâmetro toxicocinético que indica a extensão da distribuição de uma substância. Esse índice expressa o volume teórico dos compartimentos, onde o xenobiótico estaria uniformemente distribuído. Grande volume de distribuição (30-45 L para um

homem de cerca de 75 kg) indica que o xenobiótico é distribuído a várias partes do organismo com uma pequena fração permanecendo no plasma. O valor de Vd relativamente pequeno indica que a maior fração do xenobiótico permanece no plasma, provavelmente como resultado da ligação às proteínas plasmáticas.

A toxicidade do xenobiótico depende de seu volume de distribuição, mas nem sempre o local de maior distribuição é o órgão mais lesado. Às vezes, um órgão funciona como simples depósito. Como já salientado, a maior afinidade de agentes lipofílicos pelos tecidos adiposos prejudica a distribuição de anestésicos ao sistema nervoso central. Ademais, o acúmulo do xenobiótico no tecido de depósito pode conferir toxicidade, como o acúmulo de flúor na matriz óssea que causa a fluorose.

## 4.2. Ligação de agentes tóxicos às proteínas

As proteínas do sangue, livres ou complexadas com hemácias ou proteínas do tipo albumina, lipoproteínas e $\alpha_1$-glicoproteína ácida em particular, têm o poder de complexar muitas moléculas. A porção de xenobióticos complexados com as proteínas é temporariamente inativa e é incapaz de atravessar membranas, enquanto a porção não complexada o faz livremente. Portanto, qualquer fator que aumente o grau de ligação protéica tende a afetar a distribuição de xenobióticos, mantendo-os na circulação sistêmica e dificultando a sua distribuição para outros compartimentos.

Dentre as proteínas ligantes, a albumina representa o componente mais importante por ser a mais abundante e por sua afinidade a grande número de substâncias. Os fármacos de caráter ácido (fenobarbital, fenilbutazona, naproxeno, indometacina, ácido valpróico) ligam-se quase que exclusivamente à albumina, enquanto os de caráter básico (quinidina, imipramina) ligam-se preferencialmente à $\alpha_1$-glicoproteína ácida.

As β-globulinas têm a importante função transportadora de esteróides androgênicos e estrogênicos. Os hormônios da tireóide ligam-se a várias proteínas, entre as quais a pré-albumina e globulina ligantes de tiroxina. O cortisol é transportado complexado à transcortina.

As ligações entre as substâncias químicas e as proteínas plasmáticas ocorrem por meio de ligações fracas, como ligações hidrofóbicas, em que participam as forças dipolo-dipolo e de van-der-Waals.

As lipoproteínas são complexos macromoleculares de elevado peso molecular e transportam ativamente lipídios insolúveis no plasma e substâncias lipossolúveis de caráter básico, como anestésicos locais, clorpromazina, imipramina etc. No entanto, vale ressaltar que essas mesmas substâncias são transportadas também pela $\alpha_1$-glicoproteína ácida.

A competição entre dois xenobióticos, frente a sítio comum de ligação de moléculas protéicas, tende a impedir mutuamente a fixação, aumentando as suas porções livres. Esse mecanismo é de suma importância na interação entre os medicamentos, podendo haver aumento do efeito terapêutico e tóxico ou ineficácia da terapia. Por exemplo, doenças hepáticas alteram a capacidade fixadora de xenobióticos por alterarem a produção de proteínas e a conseqüente concentração protéica no plasma, podendo acarretar acúmulo de substâncias endógenas, tais como bilirrubina e ácidos biliares que podem deslocar moléculas de seus sítios de fixação.

Os xenobióticos livres são transportados aos tecidos, onde podem se fixar aos componentes teciduais. As concentrações alcançadas nos tecidos dependem, portanto, do fluxo sangüíneo e da afinidade dos xenobióticos aos componentes teciduais. A absorção pelas células, como já descrito anteriormente, é dependente da capacidade do agente de atravessar membranas, portanto, depende do tamanho da molécula, da lipossolubilidade e da presença de transportes ativos específicos. Por exemplo, as moléculas hidrossolúveis de peso molecular inferior a 50 daltons passam através de poros, enquanto as de peso molecular superior a este possuem, na maioria das vezes, mecanismo especial de transporte.

## 4.3. Barreiras biológicas

Cada membrana constitui uma barreira na passagem de substâncias dissolvidas no sangue para os tecidos.

Entre as barreiras, merecem destaque as que separam o compartimento sangüíneo do sistema nervoso central e do feto. São as denominadas, respectivamente, barreira hematoencefálica e placentária. Ambas apresentam estruturas anatômicas e funcionais especiais que lhes permitem uma capacidade seletiva maior de substâncias.

Diferente dos demais capilares, os cerebrais possuem células justapostas, não deixando espaços entre elas; além disso, são revestidos por astrócitos que são pequenas expansões das células da glia.

A placenta, por sua vez, é formada por tecidos fetais e maternos provenientes do endométrio. A parte fetal é formada pelo cório, constituído por uma lâmina epitelial denominada trofoblasto, que recobre o tecido conjuntivo (mesênquima) altamente vascularizado. O cório apresenta-se sob a forma de troncos vilosos ramificados (vilosidades coriônicas) nos espaços conhecidos como câmaras vilosas, onde o sangue da mãe é conduzido pelas artérias espiraladas do endométrio. A

placenta permite basicamente: a) a passagem de nutrientes da mãe para o feto; b) a troca gasosa, fornecendo oxigênio ao feto e retirando o gás carbônico; c) a remoção de material excretado pelo feto e d) o controle hormonal do feto. A placenta possui a capacidade de biotransformar muitas das substâncias que ali chegam, graças à presença de sistemas enzimáticos.

Tanto a barreira hematoencefálica como a placentária são dotadas de transportes ativos de absorção e efluxo que protegem seletivamente o sistema nervoso central e o feto da ação de xenobióticos. A presença destes transportes de *multidrug resistant proteins*, por exemplo, protege o feto da ação de alguns quimioterápicos e pesticidas.

## 5. BIOTRANSFORMAÇÃO

Os xenobióticos absorvidos são posteriormente excretados pela urina, bile, fezes, ar expirado, leite, suor, lágrima ou saliva sob forma inalterada ou modificada quimicamente.

Como já salientado, o comportamento cinético de xenobióticos depende de suas propriedades físico-químicas. As substâncias lipofílicas são facilmente absorvidas, porém não são facilmente excretadas, uma vez que sofrem reabsorção em função de sua facilidade de atravessar as membranas celulares. A tendência dessas substâncias é de acumular-se no organismo. Por outro lado, as substâncias hidrofílicas têm absorção mais precária, mas sua excreção se faz facilmente principalmente por via renal.

Os metabólitos encontrados na urina e nas fezes geralmente são polares e hidrossolúveis. Para facilitar a excreção de xenobióticos lipofílicos, o organismo dispõe de mecanismos bioquímicos que transformam as substâncias pouco polares e lipossolúveis em substâncias mais polares e hidrossolúveis.

Biotransformação é toda alteração que ocorre na estrutura química da substância no organismo. A biotransformação de xenobióticos é catalisada por enzimas inespecíficas, que metabolizam substâncias endógenas que também devem sofrer biotransformação para sua renovação. Algumas substâncias sofrem degradação não enzimática, como, por exemplo, o bicarbonato de sódio que reage com o ácido clorídrico gástrico, sendo eliminado na forma de cloreto de sódio, gás carbônico e água.

### 5.1. Tipos de reações

As reações de biotransformação são divididas em reações de fase I e de fase II. As reações de fase I – oxidação, redução e hidrólise – conferem polaridade aos xenobióticos por expor ou inserir grupamentos sulfidrila, hidroxila, amina ou carboxila, que resultam em aumento na hidrofilicidade. Estes metabólitos podem conferir maior toxicidade que o composto original pelo caráter eletrofílico, nucleofílico ou radicalar que adquirem. Nesta condição podem ser mais tóxicos que o composto original e o processo é chamado de *bioativação* (Tabela 4).

**Tabela 4.** Metabólitos ativos.

| | |
|---|---|
| Alopurinol | Aloxantina |
| Amitriptilina | Nortriptilina |
| Hidrato de cloral | Tricloroetanol |
| Clordiazepóxido | Desmetilclordiazepóxido |
| Codeína | Morfina |
| Diazepam | Desmetildiazepam |
| Digitoxina | Digoxina |
| Imipramina | Desipramina |
| Meperidina | Normeperidina |
| Metanfetamina | Antetamina |
| Fenacetina | Paracetamol |
| Fenilbutazona | Oxifembutazona |
| Paration | Paraoxon |

As reações de fase II – glicuronidação, sulfatação, acetilação, metilação, conjugação com a glutationa e com aminoácidos – são caracterizadas pela incorporação de co-fatores endógenos às moléculas provenientes das reações de fase I. Esta cascata de reações ocorre na maioria das vezes, mas existem exceções, como a morfina, heroína e codeína, que sofrem diretamente conjugação com ácido glicurônico. As reações de fase II consistem das sintetases, responsáveis pela síntese de co-fatores, e das transferases, que catalisam a transferência dos mesmos.

As enzimas de biotransfomação são amplamente distribuídas pelo organismo, mas o tecido de maior concentração é o hepático. Outros órgãos, tais como pulmões, rins, adrenais, pele e mucosa gastrintestinal, também possuem enzimas que metabolizam agentes químicos.

O fígado, ao receber todo o sangue que perfunde a árca esplâncnica, entra em contato com a maior parte dos nutrientes e outras substâncias exógenas, absorvidos no intestino antes de ser distribuído. Esta característica da absorção oral é chamada de efeito de primeira passagem. Especial atenção deve ser dada a substâncias que são administradas por via oral e metabolizadas por enzimas hepáticas, uma vez que podem ser ativadas ou inativadas na primeira passagem pelo fígado.

O fígado, quando removido e submetido à homogeneização seguida de centrifugações sucessivas a velocidades crescentes, fornece diversas frações das células hepáticas. O precipitado de 9.000 g apresenta núcleos, mitocôndrias, lisossomas e fragmentos de membranas; o precipitado de 105.000 g contém fragmentos de retículo endoplasmático denominado microssomas, enquanto o sobrenadante ou citosol possui enzimas solúveis, daí o nome fração solúvel. As reações de biotransformação de xenobióticos são referidas freqüentemente como microssômicas ou citosólicas, conforme as localizações subcelulares das enzimas atuantes. As enzimas microssômicas catalisam a maioria das reações da fase I, enquanto as enzimas citosólicas são responsáveis principalmente por biotransformações da fase II.

**5.1.1. Reações de fase I.** ***Oxidação.*** As enzimas que compõem o sistema citocromo P-450 (CYP) são de maior importância entre as envolvidas nas reações da fase I da biotransformação de xenobióticos lipofílicos. Essas enzimas, juntamente com a NADPH citocromo P-450 redutase e o citocromo b5 redutase, constituem o sistema citocromo P-450, conhecido como sistema oxidase de função mista ou simplesmente P-450. Neste sistema, o citocromo P-450 é a enzima terminal com afinidade aos diversos substratos, enquanto a NADPH citocromo P-450 redutase é a enzima intermediária responsável pela transferência de elétrons provenientes da fonte geradora, o NADPH, para o citocromo P-450. O citocromo b5 acompanha o citocromo P-450 e funciona como alternativa na transferência de elétrons da fonte para o citocromo P-450. Essas enzimas encontram-se fixas aos fosfolipídios constituintes da membrana do retículo endoplasmático.

O citocromo P-450 é uma hemoproteína, com o átomo de ferro no seu núcleo, e é assim conhecido pelo fato de o complexo formado entre a sua forma reduzida e o monóxido de carbono apresentar um pico de absorbância espectrofométrica no comprimento de onda 450 nm. Certas substâncias administradas em ratos e camundongos modificam o espectro máximo do citocromo P-450, deslocando-o de 450 nm para o nível de 448 nm. Essa alteração espectral provoca alteração também da capacidade catalisadora do sistema. Conhecem-se atualmente múltiplas formas do citocromo P-450, variando entre si quanto à especificidade de ação e quanto à estrutura de cadeias polipeptídicas.

Estudos moleculares realizados até o presente identificaram 267 famílias de CYP 450, codificadas por mais de 5.000 genes (In: http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP-450.html em 28/07/2007).

As isoenzimas do citocromo P-450 são, portanto, representadas pela sigla CYP, seguida de um algarismo que indica a família, uma letra que indica a subfamília e outro algarismo que indica o gene. Por exemplo, CYP3A2 significa a isoenzima 2 da família 3 e subfamília A.

***Mecanismo de oxidação e de redução de substratos pelo citocromo P-450.*** O substrato complexa-se com a forma oxidada do citocromo P-450 que recebe um elétron procedente de NADPH, via NADPH citocromo P-450 redutase. Esse elétron reduz o $Fe^{3+}$ da fração heme do citocromo P-450 para $Fe^{2+}$. O complexo liga-se então à molécula de oxigênio e capta mais um elétron procedente também de NADPH. O segundo elétron é, às vezes, procedente de NADH e é transportado pelo citocromo b5. Ambos os elétrons são transferidos ao oxigênio molecular desmembrando-o em átomos de oxigênio altamente reativos e instáveis. Um desses átomos de oxigênio liga-se à molécula de substrato, resultando em um substrato oxidado que se desliga do complexo enzimático, enquanto outro átomo de oxigênio é utilizado na produção da molécula de água. A enzima, por sua vez, se oxida para reiniciar o novo ciclo (Figura 3).

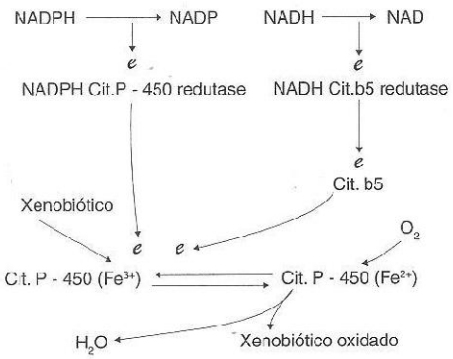



**Figura 3.** Oxidação de xenobióticos catalisada pelo citocromo P-450.

***Redução.*** Além das reações de oxidação, o citocromo P-450 catalisa também algumas reações de redução. Naturalmente essas reações ocorrem em condições de baixa concentração de oxigênio. Azo-redução, nitro-redução e desalogenação redutiva são exemplos dessas reações. O tetracloreto de carbono ($CCl_4$) e halotano ($CF_3CHBrCl$) são exemplos clássicos de bioativação sob ação do citocromo P-450 com a formação de radicais intermediários livres e tóxicos. Nessas reações, o citocromo P-450 transfere o elétron diretamente ao substrato, reduzindo-o, em vez de utilizá-lo na ativação do oxigênio.

Xenobióticos com grupamentos aldeído, cetona, dissulfeto, sulfóxido, quinonas, N-óxidos, alquenos, azo e nitro, além de alguns metais, sofrem redução *in vivo*. Estas reações podem bioativar o composto, deixando-o mais tóxico que o original ou inativá-lo, facilitando sua eliminação. Um exemplo de bioativação é a nitro-redução que ocorre pelas enzimas da microflora intestinal. Compostos nitro-aromáticos, como o 2,6 dinitrotolueno, reduzido na flora intestinal, passa a ser reabsorvido na forma de nitro-álcool, que no fígado é novamente metabolizado, gerando íons radicalares que se ligam a grupamentos nucleofílico como proteínas e DNA hepático. Este parece ser determinante para a carcinogenicidade hepática.

***Hidrólise.*** Xenobióticos compostos de grupamentos funcionais éster, ácido carboxílico, amidas, tio-ésteres, ésteres de ácido fosfórico sofrem hidrólise catalisada por carboxilesterases, pseudocolinesterases e paroxonases. Estas enzimas possuem ampla distribuição tecidual e plasmática.

As reações de fase I, na maioria das vezes, torna o composto mais reativo para a subseqüente inativação por reações de fase I ou de fase II. A metabolização do etanol ilustra a participação de enzimas de fase I na formação de um agente mais tóxico (aldeído) que o original (etanol) e em seguida uma outra reação de fase I transforma o aldeído em ácido carboxílico, menos tóxico que seu precursor, e a forma de excreção urinária (Figura 4).

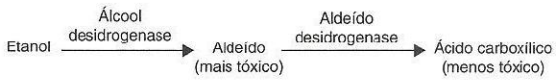



**Figura 4.** Biotransformação do etanol.

**5.1.2. Reações de fase II.** Conforme já mencionado, as reações de fase II compreendem aquelas em que as moléculas de xenobióticos são complexadas a outras moléculas sintetizadas no próprio organismo. As reações compreendem duas etapas, a saber: 1) síntese do composto endógeno que será ligado ao xenobiótico, e 2) transferência do composto endógeno para o xenobiótico, quer seja não biotransformado ou o produto polar proveniente das reações da fase I de biotransformação. As enzimas que catalisam a primeira etapa recebem o nome genérico de sintetases e as que catalisam a segunda etapa de transferases.

***Glicuronidação.*** A glicuroniltransferase catalisa a conjugação mais freqüente em mamíferos, com exceção de algumas espécies de felinos como gatos domésticos e leões, e consiste na conjugação da molécula do xenobiótico com o ácido glicurônico. O ácido glicurônico encontra-se em forma de ácido uridinodifosfato glicurônico (AUDPG) e é o doador do grupo glicuronila. Os glicuronatos formados são polares e são excretados pelos rins e pelo fígado.

As reações de glicuronidação ocorrem nos retículos endoplasmáticos de diversos tecidos, enquanto a maioria das reações da fase II é catalisada por enzimas citosólicas. Existem várias formas de UDP-glicuroniltransferase, fato evidenciado pelos efeitos de diferentes indutores e inibidores enzimáticos.

Entre os substratos mais conhecidos da glicuroniltransferase têm-se os álcoois aromáticos e alifáticos, ácidos carboxílicos, aminas primárias e secundárias e grupos sulfidrílicos livres, formando os respectivos O, N e S-glicuronatos.

Os glicuronil conjugados são substratos da β-glicuronidase, a enzima que catalisa a degradação do complexo e encontrada principalmente na microflora intestinal. Portanto, os conjugados excretados pela bile podem sofrer ação da β-glicuronidase, com liberação de agliconas, que podem ser reabsorvidas e contribuírem para a recirculação entero-hepática. Os N-glicuronatos são mais resistentes à ação de β-glicuronidase do que os O e S-glicuronatos. Os glicuronatos são degradados também por hidrólise, na presença de ácidos e bases.

A glicuroniltransferase está quase ausente nos recém-nascidos. Esta é a razão pela qual os neonatos mostram dificuldade de metabolização da bilirrubina, apresentando alta incidência de intoxicação por hiperbilirrubinemia.

***Sulfotransferase.*** A conjugação com o ácido sulfúrico, outra reação importante em mamíferos, é catalisada por sulfotransferases, um grupo de enzimas solúveis encontrado no fígado, rins, intestino, pulmões e outros tecidos. O doador do grupo sulfato é o 3'-fosfoadenosina-5'-fosfossulfato (PAPS), sintetizado a partir do ATP e sulfato inorgânico. Os substratos apresentam hidroxila nas suas moléculas, como fenóis e álcoois alifáticos. Os produtos dessas reações são sulfatos orgânicos ionizados e excretados predominantemente com a urina.

No processo de desintoxicação participam quatro tipos de sulfotransferases: a) arilsulfotransferase que conjuga fenóis, catecolaminas e hidroxiaminas orgânicas; b) hidroxiesteróide sulfotransferase que conjuga hidroxiesteróides e certos álcoois primários e secundários; c) estrona sulfotransferases que atuam sobre grupos fenólicos e anel aromático de esteróides e d) transferases de sais biliares que catalisam a sulfatação de ácidos biliares conjugados e não conjugados.

***Metilação.*** A metilação, responsável pelo metabolismo de vários compostos endógenos, é catalisada

por diferentes enzimas designadas genericamente metiltransferases. Os substratos envolvidos na metilação são aminas aromáticas e alifáticas, N-heterocíclicos, fenóis mono e polihídricos e compostos contendo grupo sulfidrílico. O doador do grupo metila é a S-adenosilmetionina que é sintetizada na presença de enzimas da fração solúvel do fígado. Como exemplos dessas reações têm-se a O-metilação de catecolaminas, a N-metilação de serotonina, benzilamina, anfetamina e piridina, S-metilação de dietilditiocarbamato. As enzimas atuantes são N-metiltransferase, O-metiltransferase e S-metiltransferase, conforme a transferência do grupo metila se faça para o nitrogênio, oxigênio ou para o enxofre da molécula da substância.

***Acetilação.*** A acetilação de aminas constitui uma das principais vias de biotransformação de arilaminas na maioria das espécies. As enzimas atuantes na acetilação são denominadas N-acetiltransferases e estão localizadas no citosol. O co-fator dessas reações é a acetilcoenzima A. Os substratos mais conhecidos são aminas primárias aromáticas, hidrazinas, hidrazidas, sulfonamidas e certas aminas alifáticas primárias.

Ocorre uma variabilidade entre espécies, os cães são desprovidos de N-acetiltransferase, portanto, são incapazes de metabolizar grande número de substratos. O homem, os camundongos, os coelhos e alguns macacos apresentam polimorfismo de acetilação e são classificados como acetiladores rápidos e lentos, baseados na sua capacidade de acetilar isoniazida. A suscetibilidade ao câncer induzido pelas aminas aromáticas pode ser dependente de polimorfismo em atividade N-acetiltransferase. Dados epidemiológicos demonstram que acetiladores lentos são mais suscetíveis ao câncer induzido por corantes aromáticos e benzidina. Estas substâncias são reativas, causando carcinogênese, e são acetilados para inativação e eliminação.

***Conjugação com a glutationa.*** A conjugação de agentes tóxicos com o tripeptídio glutationa é catalisada, na sua fase inicial, pela glutationa S-transferase, localizada no citoplasma e no retículo endoplasmático do fígado, intestino, rins e glândulas adrenais. As atividades citosólicas são, de regra, 5 a 40 vezes maiores do que as microssômicas. O co-fator para as reações catalisadas por essas enzimas é a glutationa (GSH) que é formada por 3 aminoácidos, a glicina, o ácido glutâmico e a cisteína. As glutationas S-transferases catalisam a reação de sulfidril nucleófilo da glutationa com compostos contendo átomos de carbono eletrofílicos, característica requerida para os substratos. Ademais, os agentes químicos devem ser hidrofóbicos e devem reagir não enzimaticamente com a glutationa, impedindo sua inativação. Os produtos conjugados sofrem hidrólise, gerando derivados cisteínicos, principalmente nos rins onde são acetilados formando a N-acetilcisteína (ácido mercaptúrico).

A glutationa S-transferase catalisa a reação de diversos xenobióticos eletrofílicos com a glutationa endógena nucleofílica, prevenindo dessa forma as reações dos xenobióticos com constituintes neutrofílicos teciduais, como lipídeos, DNA e proteínas. Substâncias tóxicas do tipo bromobenzeno e clorofórmio são biotransformadas pelo sistema enzimático do citocromo P-450 gerando metabólitos altamente reativos. Se não forem eficientemente conjugados com a glutationa, se acumulam e reagem com os constituintes endógenos, causando toxicidade.

Qualquer fator que reduza a concentração de GSH pode aumentar a toxicidade de substâncias que originam metabólitos reativos, como radicais livres. Estes próprios radicais, se em altas concentrações, podem depletar os estoques celulares de GSH, levando ao estresse oxidativo e conseqüente peroxidação lipídica. Maiores detalhes podem ser consultados no Capítulo de "Radicais Livres e Antioxidantes".

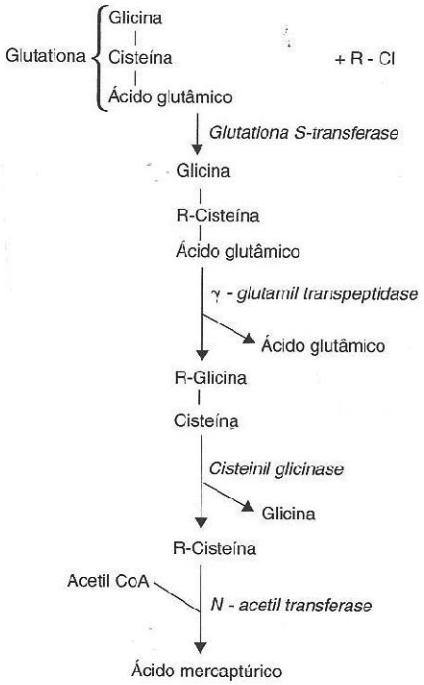



**Figura 5.** Conjugação com glutationa e sua degradação.

**5.1.3. Reações extra-hepáticas.** Os tecidos pulmonar, renal, intestinal, além da pele e das mucosas também participam do processo de biotransformação de xenobióticos. Os microrganismos intestinais são outros elementos importantes na biotransformação de substâncias. Esses microrganismos, constituídos de mais de

400 espécies bacterianas, muitas vezes, transformam substratos em metabólitos menos hidrossolúveis e, sob condições anaeróbicas do intestino, promovem reações de redução. A presença também de β-glicuronidase no intestino contribui para introduzir modificações estruturais de substratos excretados com a bile, levando à reabsorção de substâncias e ao ciclo entero-hepático.

## 5.2. Fatores que modificam a biotransformação

Os fatores que interferem na biotransformação podem ser classificados em internos ou externos. Fatores internos são aqueles relacionados ao próprio sistema biológico. Fatores externos são os dependentes das próprias substâncias, vias de exposição e do meio ambiente.

### 5.2.1. Fatores internos

***Espécie e raça.*** Esses fatores determinam variações qualitativa e quantitativa de biotransformações, dependendo da presença ou ausência de enzimas e da concentração de cada enzima. As variações qualitativas podem ser observadas, por exemplo, na biotransformação do inseticida N-2-fluorenilacetamida (FAA) que sofre reação de N-hidroxilação em ratos, camundongos, cães, mas não em cobaias. As espécies que são capazes de realizar a N-hidroxilação do FAA são mais sensíveis ao desenvolvimento de tumores do que as cobaias, uma vez que o composto hidroxilado é mais reativo que o composto inicial. As variações quantitativas podem ser exemplificadas pela toxicidade do inseticida O, O-diisopropilbenziltiofosfato em ratos e em camundongos. O valor de $DL_{50}$ desse inseticida varia sensivelmente entre as duas espécies. Os camundongos são mais susceptíveis ao inseticida do que os ratos, pela menor capacidade de biotransformação do composto.

O hexobarbital, barbitúrico de ação ultra-curta, é oxidado, em velocidade variável, entre os ratos Holtzman, Sprague-Dawley e Wistar, conseqüentemente o tempo de sono induzido pelo fármaco varia em função da velocidade da biotransformação nesses ratos.

***Fatores genéticos.*** A capacidade metabolizadora de agentes químicos varia sensivelmente de um indivíduo para outro, conforme as suas condições fisiológicas ou de doenças associadas. Os fatores genéticos contribuem com estas variações. A concentração plasmática de isoniazida pode variar entre indivíduos que receberam a mesma dosagem. As diferentes concentrações obtidas, quando representadas em histograma de freqüência de distribuição, mostram uma curva descontínua ou bimodal, isto é, existem dois grupos distintos de indivíduos, com capacidade diferente de metabolizar isoniazida. De fato, a isoniazida é biotransformada no organismo por acetilação e sua velocidade varia entre os pacientes. Alguns conseguem acetilar rapidamente e outros lentamente, formando-se assim, duas subpopulações que representam dois fenótipos distintos. A proporção entre os acetiladores rápidos e lentos é variável conforme a raça. Entre os caucasianos, a proporção de acetiladores lentos é elevada, atingindo 50 a 60%. Entre os orientais, há predomínio de acetiladores rápidos.

A literatura é muito abrangente quanto às diferenças de efeitos entre espécies decorrentes de variações na biotransformação. Coelhos são resistentes às ações tóxicas da atropina. Esses animais possuem a enzima atropinesterase, que hidrolisa rapidamente a atropina. Esta enzima, que é produzida por um gene ou par deste, está ausente na maioria das espécies de mamíferos, incluindo o homem.

***Gênero.*** Existe variação da intensidade de biotransformação entre o sexo masculino e feminino. Os ratos machos, por exemplo, são capazes de metabolizar mais rapidamente o hexobarbital, assim como a zoxazolamina do que as fêmeas e, conseqüentemente, os machos exibem menor efeito farmacológico desses fármacos. Em ratos machos, o teor de citocromo P-450 é, em média, cerca de 40% maior do que nas fêmeas. Assim, os machos possuem maior capacidade de biotransformar substâncias lipofílicas, por meio de enzimas microssômicas reduzindo a meia-vida biológica dessas substâncias em relação à das fêmeas. Conseqüentemente, os efeitos farmacológicos e toxicológicos também variam entre os machos e as fêmeas. Tratando-se de substâncias ativas que geram metabólitos inativos, seus efeitos serão menores nos machos do que nas fêmeas. Entretanto, tratando-se de substâncias cujos metabólitos são mais ativos do que a própria substância que lhes deu origem, os efeitos serão mais acentuados nos machos. Por esse mecanismo, explica-se a maior toxicidade hepática de tetracloreto de carbono e halotano em ratos machos, assim como maior nefrotoxicidade do halotano em camundongos machos.

As ratas tratadas com testosterona adquirem maior capacidade de biotransformar fármacos e xenobióticos, aproximando-se à dos machos. Inversamente, a castração de ratos machos reduz sua capacidade de biotransformar xenobióticos. O estradiol não modifica a atividade nos ratos machos e fêmeas castrados. A ação anabólica dos hormônios sexuais masculinos é tida como a principal responsável pelas diferenças entre os gêneros.

Na espécie humana, a diferença na capacidade de biotransformar xenobióticos não é acentuada a ponto de determinar toxicidade diferente entre homens e mulheres. Entretanto, o uso de anticoncepcionais pelas mulheres pode exercer influência na capacidade de biotransformação.

***Idade.*** Fetos e recém-nascidos são praticamente desprovidos da capacidade bioquímica de biotransformar xenobióticos, razão pela qual os recém-nascidos são altamente susceptíveis à ação tóxica de xenobióticos. Certas proteínas presentes no soro fetal parecem reprimir a formação de enzimas do citocromo P-450.

Os fetos humanos, no seu segundo trimestre de desenvolvimento, apresentam 20 a 50% das atividades das enzimas do citocromo P-450. Entretanto, o padrão de isoenzima é qualitativamente diferente daquele apresentado pelos adultos. Esse padrão de desenvolvimento ontogenético parece ser comum a diversas espécies e tem sido caracterizado com vários substratos.

Após o nascimento ocorre rapidamente o desenvolvimento da atividade bioquímica. Em ratos, aos 30 dias de vida, a atividade do citocromo P-450 atinge intensidade máxima e, em seguida, começa a declinar lentamente com a idade, chegando a 50 e 60% do máximo aos 600 dias, o que correspondente à senilidade. A maior toxicidade de certos xenobióticos em pessoas idosas é explicada, em parte, pela queda na intensidade de biotransformação, além da sua baixa capacidade de excreção renal. O efeito miorrelaxante do carisoprodol, fármaco de ação central, é inversamente proporcional à intensidade de biotransformação do fármaco, uma vez que o metabólito formado é menos ativo. Em doses proporcionais ao peso corpóreo, o carisoprodol exibe efeito mais pronunciado em animais neonatos e idosos que em adultos.

***Estado nutricional.*** Experiências em ratos mostram que, em estado de desnutrição, o tempo de sono induzido pelo hexobarbital é aumentado. A redução da atividade enzimática é devida basicamente à diminuição das proteínas, decorrentes da desnutrição. Outros elementos nutricionais tais como ferro, cobre, magnésio, cálcio, zinco, vitaminas do complexo B, ácido ascórbico e tocoferol são igualmente importantes, uma vez que esses elementos participam da composição e da manutenção da integridade do sistema oxidase de função mista. Assim, dietas pobres em proteínas aumentam a toxicidade de substâncias ativas, mas reduzem a de substâncias que necessitam de biotransformação prévia para se tornarem ativas. A letalidade e a hepatotoxicidade da dimetilnitrosamina são baixas em ratos mantidos sob dieta pobre em proteínas. Nesses animais, a intensidade de N-desmetilação do composto é reduzida, prevenindo a primeira fase de sua conversão para um agente alquilante.

O jejum de um dia reduz drasticamente a concentração de glutationa hepática. Nessas condições, há potencialização da hepatotoxicidade do paracetamol, bromobenzeno e outros compostos que são desintoxicados pela glutationa.

***Estado patológico.*** A biotransformação de xenobióticos pode ser alterada sob diversas condições de doenças. As doenças hepáticas em particular, como cirrose, icterícia obstrutiva, carcinomas e hepatite, acarretam reduções drásticas das atividades enzimáticas do fígado, acompanhadas de queda da taxa de biotransformação de agentes químicos. Comprometimentos cardiovasculares que resultam na diminuição do fluxo sangüíneo hepático modificam igualmente a biotransformação e a depuração de xenobióticos.

**5.2.2. Fatores externos.** Entre os fatores externos que interferem na biotransformação estão certas substâncias que atuam sobre os sistemas enzimáticos, ativando-os ou inibindo-os. São os indutores e os inibidores enzimáticos (Tabela 5).

***Indução enzimática.*** A atividade enzimática do sistema oxidase de função mista, responsável pela maioria das reações oxidativas de xenobióticos (citocromo P-450), pode ser estimulada por substâncias do tipo hormônios esteroidais, inseticidas clorados, barbitúricos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos etc. Esse fenômeno chamado indução enzimática, além de acelerar a biotransformação de vários xenobióticos, estimula também a sua própria, pelo aumento da síntese protéica, resultando em fenômeno de tolerância metabólica ou cinética.

O primeiro relato sobre a indução enzimática foi feita no início da década de 1950 por Richardson e seus colaboradores, após observarem que o potente agente carcinogênico, dimetilaminoazobenzeno (DMAAB) não produz hepatomas quando administrado juntamente com o 3-metilcolantreno. Inicialmente, a indução foi observada com a monooxigenase dependente do citocromo P-450, porém outras enzimas, como álcool desidrogenase e transferases,

também podem ser induzidas após exposição a estes agentes indutores.

O fenobarbital e o 3,4-benzopireno são os protótipos de agentes indutores enzimáticos potentes. Eles representam as duas classes de indutores. A indução por fenobarbital é demorada; em experiências laboratoriais, a indução em ratos requer pelo menos três dias de tratamento com o fármaco. Por outro lado, o efeito indutor do 3,4-benzopireno é rápido, instalando-se em poucas horas. Em compensação, a duração da indução pelo fenobarbital mais é curta do que a causada pelo 3,4-benzopireno. A indução pelo fenobarbital caracteriza-se por aumento do volume do fígado, proliferação do retículo endoplasmático, da síntese protéica e do teor do citocromo P-450, enquanto que na indução pelo 3,4-benzopireno estas alterações são menos acentuadas.

As interações que ocorrem entre os fármacos, muitas vezes, são decorrentes da indução enzimática provocada por um dos agentes. É o caso, por exemplo, da interação entre o antibiótico rifampicina e o anti-coagulante varfarina, em que a rifampicina age como indutor enzimático e reduz a concentração plasmática da varfarina. Na vigência da ação do indutor, uma dose maior de varfarina é requerida, por causa de sua rápida metabolização, entretanto, quando se interrompe a administração do indutor, a velocidade de biotransformação do anticoagulante volta a ser normal e a dose utilizada passa a ser tóxica, podendo provocar grave hemorragia.

Em animais previamente tratados com indutores enzimáticos, como fenobarbital, fenilbutazona e aminopirina, os efeitos farmacológicos da zoxazolamina e do hexobarbital são significativamente reduzidos, ao mesmo tempo em que seu metabolismo é aumentado. A atividade analgésica da associação de propoxifeno, paracetamol e hidroxizina *in vivo* é igualmente diminuída, quando estas são administradas juntamente com o fenobarbital.

O 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD), um potente indutor de atividade aril-hidrocarbono hidroxilase (AHH), liga-se a um receptor citosólico, chamado AhR (receptor de hidrocarboneto), presentes em inúmeras células, entre as quais a hepática. O complexo agonista-receptor é translocado para o núcleo, onde se liga a regiões específicas do DNA e codifica para síntese de proteínas, entre as quais as enzimas de biotransformação, como as do citocromo P-450. Outros agonistas do receptor AhR, como o benzopireno, o 3-metilcolantreno, outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e 3,3',4,4'-tetraclorobifenila deslocam o TCDD de seu receptor, induzindo síntese protéica pelo mesmo mecanismo.

**Tabela 5.** Alguns indutores e inibidores do citocromo P-450.

| Citocromo P-450 | Indutores | Inibidores |
|---|---|---|
| CYP1A | Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos | Fluvoxamina |
| | Benzopireno | Furafilina |
| | Rifampicina | |
| CYP2B | Fenobarbital | |
| CYP2C | Carbamazepina | Fluoxetina |
| | Rifampicina | Omeprazol |
| | Prednisona | Fluvoxamina |
| CYP2D | Rifampicina | Fluoxetina |
| | | Quinidina |
| | | Cimetidina |
| CYP2E | Etanol, Isoniazida | Dissulfiram |
| CYP3A | Barbitúricos | Cetoconazol |
| | Carbamazepina | Itraconazol |
| | Fenitoína | Eritromicina |
| | Rifampicina | |

Outro mecanismo para aumentar a biotransformação é a estabilização da enzima contra a degradação. Este pode ser um mecanismo envolvido no aumento da concentração de CYP2E1 pelo etanol, acetona e pirazol. A concentração aumentada da CYP2E1 tem importantes implicações toxicológicas, já que esta enzima é responsável pela ativação de inúmeras substâncias ambientais (tetracloreto de carbono, dimetilnitrosamina) a metabólitos tóxicos e carcinogênicos.

As isoenzimas do citocromo P-450 de tecidos extra-hepáticos não são prontamente induzidas pelo fenobarbital e compostos que produzem um padrão similar de indução. Entretanto, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são efetivos em tecidos extra-hepáticos tais como pulmões, rins, trato intestinal e pele, uma vez que o receptor AhR está presente nesses tecidos.

Com exceção de GSH-S-transferases, a maioria das enzimas de biotransformação de fase II não é facilmente induzida.

***Inibição enzimática.*** Certas substâncias são capazes de reduzir a biotransformação de xenobióticos, inibindo expressão e atividade das enzimas metabolizadoras e assim são chamadas inibidores enzimáticos.

A inibição enzimática envolve mecanismos múltiplos, desde a inibição da síntese protéica até a competição com os substratos nos centros ativos comuns das enzimas. Dentre as numerosas enzimas que so-

frem interferência de inibidores, assumem especial importância as colinesterases, a monoaminooxidase (MAO), a aldeídodesidrogenase, o citocromo P-450.

A inibição dessas enzimas causa acúmulo de seus substratos no organismo e, conseqüentemente, aumento da intensidade e duração de seus efeitos biológicos. Os fármacos, sob influência de inibidores, tendem a apresentar efeitos terapêuticos, assim como efeitos adversos mais acentuados. Entretanto, tratando-se de substâncias que sofrem bioativação, a inibição enzimática tende a reduzir seu efeito. A intoxicação por metanol, por exemplo, pode ser amenizada, retardando sua passagem para o formaldeído, que é o metabólito tóxico.

A inibição da aldeído-desidrogenase foi outrora utilizada no tratamento do alcoolismo crônico. O dissulfeto de tetraetiltiuram (dissulfiram) foi o fármaco mais usado e, na vigência de sua ação, a ingestão de bebida alcoólica provocava uma série de sintomas de intoxicação, como náuscas, vômito e hipotensão, desencadeados pelo acúmulo de aldeído. Ao associar o mal estar ao uso do álcool, o paciente abandonava o consumo da bebida alcoólica.

A inibição da monoaminoxidase (MAO) pela tranilcipromina, que promove acúmulo de neurotransmissores, como dopamina, norepinefrina e serotonina nos seus sítios de ação, é um dos tratamentos utilizados em neuropsiquiatria. A inibição da degradação da acetilcolina pela acetilcolinesterase pode ter aplicação terapêutica ou ser mecanismo de intoxicação. O benefício farmacológico é demonstrado pelo emprego da neostigmina em circunstâncias que requerem maior atividade muscarínica sobre os órgãos, tais como intestino, bexiga, após uma cirurgia, e nas placas terminais para acelerar o desbloqueio neuromuscular. A inibição da enzima acetilcolinesterase é o mecanismo da intoxicação por inseticidas organofosforados. Assim, a intoxicação por esses agentes caracteriza-se pela acentuada sudorese, salivação, lacrimejamento, miose, diarréia, desencadeados pelo acúmulo de acetilcolina (Tabela 6).

**Tabela 6.** Inibidores de enzimas não pertencentes ao citocromo P-450.

| Inibidor | Enzima | Efeito |
|---|---|---|
| Inseticidas fosforados | Colinesterases | Acúmulo de acetilcolina nos seus sítios de ação |
| Tranilcipromina<br>Fenelzina | Monoaminoxidase | Acúmulo de neurotransmissores adrenérgicos |
| Dissulfiram<br>Furazolidina<br>Metronidazol | Aldeído desidrogenase | Acúmulo de aldeído no organismo |
| 3-metilpirazol | Álcool desidrogenase | Acúmulo de álcoois |

O citocromo P-450 é inibido por várias substâncias. Tem sido mostrado experimentalmente que o SKF525-A (éster dietilaminoetanol do ácido difenilpropilacético), inibidor das enzimas do citocromo P-450, por si só não produz efeito farmacológico importante, mas prolonga os efeitos de fármacos lipossolúveis do tipo barbitúrico, zoxazolamina, analgésicos e outros. Neste caso, a associação do hexobarbital com o SKF525-A prolonga o tempo de sono induzido pelo hexobarbital em cerca de três vezes. O SKF525-A atua sobre o sistema citocromo P-450 por mecanismo não competitivo.

Em menor grau, a etionina, a puromicina, a dactinomicina, o cloranfenicol, a tetraciclina, entre outros, inibem o sistema enzimático do retículo endoplasmático, por interferir na síntese protéica.

## 6. EXCREÇÃO

Excreção é o processo pelo qual uma substância é eliminada do organismo. Os agentes tóxicos são excretados por diferentes vias e, na maioria das vezes, sob forma de produtos mais hidrossolúveis, após sua biotransformação.

As vias de excreção mais representativas são a urinária, a fecal e a pulmonar. A urina excreta substâncias hidrossolúveis, enquanto as fezes carregam substâncias não absorvidas no trato digestivo e também os produtos excretados pela bile. A via pulmonar é a responsável pela excreção de gases e vapores.

### 6.1. Excreção renal

Os rins exercem importante papel depurador do sangue, excretando substâncias polares e hidrossolúveis. São basicamente três os mecanismos envolvidos na formação da urina e na excreção de substâncias, a saber: filtração glomerular, reabsorção tubular e secreção tubular.

Os capilares glomerulares possuem grandes poros (70 nm), por onde passam todos os elementos contidos no sangue, exceto algumas estruturas, como por exemplo elementos figurados do sangue e macromoléculas protéicas. Os xenobióticos ligados às proteínas não são filtrados por causa do tamanho do seu complexo, tendo, portanto, maior permanência no organismo. Após a filtração, as partículas hidrossolúveis são excretadas com a urina, enquanto as moléculas lipossolúveis são reabsorvidas pelo túbulo proximal, caindo novamente na circulação sistêmica. A excreção de substâncias de natureza ácida ou básica sofre grande influência do pH da urina, uma vez que substâncias na forma molecular

são mais facilmente reabsorvidas pelo túbulo proximal. Assim, a elevação do pH pela administração de bicarbonato de sódio aumenta a ionização de substâncias de caráter ácido, como barbitúricos e ácido acetilsalicílico facilitando sua excreção.

Alguns agentes tóxicos são excretados por processo chamado secreção tubular, que consiste na passagem desses agentes do sangue diretamente para a urina, nos túbulos proximais, por mecanismo de transporte ativo. São excretados por secreção tubular os ânions orgânicos (ácidos) e cátions orgânicos (bases) que têm como protótipos, respectivamente, o *p*-aminoipurato e a N-metilnicotinamida.

Como todo processo de transporte ativo, na secreção tubular, pode haver competição entre as substâncias de mesma natureza. Este mecanismo foi utilizado, por exemplo, para retardar a excreção e aumentar o tempo de ação da penicilina, com a associação à probenecida, um ácido que compete pelo mesmo sistema de secreção tubular que o usado pela penicilina.

No entanto, esse mecanismo competitivo pode ser prejudicial ao organismo quando concorrem substâncias tóxicas, como é o caso de diuréticos sulfonamídicos que retardam a excreção do ácido úrico, provocando seu acúmulo. A manifestação aguda desta interação pode ser a crise de gota, pelo acúmulo de ácido úrico em articulações.

Os transportes ativos também estão envolvidos no processo de reabsorção tubular. Da mesma forma que na secreção para o túbulo proximal, competição por estes sistemas interfere com o tempo de circulação de agentes químicos, conferindo aumento/diminuição de eficácia terapêutica ou de toxicidade dependendo do agente.

Polimorfismos nos sistemas de transportes ativos presentes no túbulo proximal, idade, insuficiência renal ou circulatória e interações medicamentosas alteram a excreção renal.

## 6.2. Excreção pelo trato digestivo

A parte não absorvida dos agentes químicos pela via oral é excretada com as fezes.

Nas fezes são encontrados, além de agentes tóxicos não absorvidos, como por exemplo inseticida paraquat e curare, produtos de biotransformação de diversas substâncias procedentes do fígado, via biliar. Há evidências também da passagem de substâncias do sangue diretamente para o intestino por difusão passiva. Certos ácidos e bases orgânicas podem ser excretados com as fezes, após sofrerem secreção ativa no intestino.

A excreção biliar constitui um dos mais importantes meios de prevenir a intoxicação por xenobióticos, principalmente quando estes agentes após absorção intestinal alcançam o fígado antes de cair na circulação. O efeito de primeira passagem ou eliminação pré-sistêmica são termos que indicam, entre outros, os mecanismos exercidos pelo fígado. Parte das substâncias biotransformadas no fígado concentra-se na vesícula biliar e, em seguida, transportada para o duodeno juntamente com a bile. No intestino, os xenobióticos e seus metabólitos podem ser excretados com as fezes ou, dependendo de suas propriedades físico-químicas, serem reabsorvidos, descrevendo o percurso conhecido como ciclo entero-hepático.

Conforme a relação entre as concentrações na bile e no plasma, as substâncias são classificadas em três tipos: A, B e C. As substâncias do tipo A apresentam a relação de suas concentrações na bile e no plasma de aproximadamente 1 e são representadas pelo sódio, potássio, glicose, mercúrio, tálio, césio e cobalto, entre outros. As substâncias do tipo B apresentam a relação maior do que 1 e incluem ácidos biliares, bilirrubina, sulfobromoftaleína, chumbo, arsênico, manganês etc. As do tipo C apresentam relação menor que 1 e têm como exemplo a inulina, albumina, zinco, ferro, ouro e cromo. Os compostos do tipo B são rapidamente excretados na bile. A passagem desses compostos do plasma para a bile é efetuada mediante transporte ativo.

A excreção biliar de ácidos orgânicos, como a sulfobromoftaleína e a indocianina verde, é utilizada no teste de função hepática. O teste consiste na injeção desses corantes intravenosamente e na determinação do seu perfil plasmático. Concentrações elevadas no plasma, indicam depuração biliar reduzida em decorrência ao dano hepático, uma vez que estes compostos são excretados predominantemente pela bile.

Os mecanismos de transporte ativo são importantes na excreção fecal. A existência de transportes ativos para metais no fígado favorece a excreção destes pela bile. Por exemplo, o chumbo é excretado para a bile contra gradiente de concentração, na proporção de bile para plasma de 100:1.

As substâncias de baixo peso molecular são pouco excretadas pela bile, enquanto substâncias livres ou conjugadas com peso molecular superiores a 325 daltons são excretadas em maiores quantidades. Os conjugados com glutationa ou com ácido glicurônico são excretados em grande quantidade na urina. Os conjugados excretados pela bile, que não são reabsorvidos no intestino, podem ser hidrolisados sob ação da microflora intestinal, gerando substâncias suficientemente lipossolúveis para serem reabsorvidas, alcançando o fígado e serem excretados pela bile.

A reabsorção de agentes tóxicos, em particular, é indesejável visto que, através do ciclo entero-hepático, eles terão sua meia-vida biológica aumentada.

Na intoxicação por metilmercúrio, por exemplo, utilizou-se outrora, resina politiol para complexar com o mercurial e prevenir sua reabsorção. O fenobarbital, além de favorecer as reações de conjugação por indução enzimática, aumenta o fluxo biliar e pode contribuir na excreção biliar de muitas substâncias.

### 6.3. Excreção pelos pulmões

As substâncias gasosas e voláteis são excretadas principalmente pelos pulmões. O bafômetro, utilizado para a determinação de concentração etanólica no plasma, é baseado no princípio da proporcionalidade entre a quantidade de etanol eliminada e a sua pressão de vapor.

A excreção de gases é inversamente proporcional à quantidade de sua solubilização. Por exemplo, o gás etileno, com baixa solubilidade no sangue, é rapidamente excretado pelos pulmões, enquanto que o clorofórmio, que é altamente solúvel no plasma, é excretado lentamente.

Da mesma forma que na absorção, o fator limitante de excreção para substâncias altamente solúveis no sangue é a ventilação (respiração), enquanto para substâncias pouco solúveis no sangue é a perfusão (circulação).

### 6.4. Excreção por outras vias

Agentes tóxicos podem ser excretados ainda por outras vias, tais como suor, saliva, lágrimas e leite. As excreções por estas vias são dependentes de diferenças de pHs entre o plasma e as glândulas ou tecidos, do pKa das substâncias, da lipossolubilidade e da presença de transportes ativos.

A excreção de agentes tóxicos pelo leite pode levar à intoxicação da criança amamentada, assim como intoxicação de pessoas que ingerem leite de vaca e seus produtos contaminados. As substâncias lipossolúveis do tipo DDT, policloretos e polibrometos de bifenilas são solúveis na gordura do leite e assim podem ser excretados por simples difusão. Substâncias básicas também concentram-se preferencialmente no leite do que no plasma, por diferenças de pII. O pII do leite é inferior ao do sangue.

Da mesma forma que o leite, a saliva possui pH menor que o sangue e substâncias básicas difundem mais facilmente do plasma. Assim, a saliva tem sido considerada material biológico importante para a detecção de drogas de abuso, como etanol, cocaína e anfetaminas, mesmo porque a coleta deste material é menos invasiva que o sangue e apresenta menor probabilidade de adulteração que a urina.

## 7. PARÂMETROS BIOLÓGICOS INDICADORES DA ELIMINAÇÃO

Dois parâmetros toxicocinéticos importantes que expressam a eliminação são a meia-vida ($t_{1/2}$) e a depuração (Dp) ou *clearance* (Cl).

A meia-vida representa o tempo requerido para que a concentração plasmática de um determinado agente seja reduzida a 50%, após sua completa absorção e distribuição.

A depuração é a capacidade do organismo de eliminar uma substância do plasma. Os principais órgãos envolvidos no processo de depuração são o fígado e os rins. Enquanto o fígado elimina a substância biotransformando-a em seus metabólitos e excretando-os via biliar, os rins promovem a excreção da substância e seus metabólitos juntamente com a urina. A depuração total é a soma das depurações individuais do agente químico por vários órgãos e tecidos do organismo.

A depuração renal é definida como a quantidade de excreção dividida pela concentração média da substância no plasma. A depuração renal de creatinina é normalmente usada como índice de função renal, pois essa substância endógena sofre filtração glomerular completa e é sujeita à mínima secreção tubular e reabsorção. Vários fatores interferem na depuração renal, entre os quais pH urinário, fluxo sangüíneo renal, fixação protéica da substância no plasma, idade do indivíduo e doença renal e cardiovascular.

## 8. BIBLIOGRAFIA


BORST, P.; EVERS, R.; KOOL, M.; WIJNHOLDS, J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst*, v.92, p.1295-1302, 2000.

BOWMAN, W.C.; RAND, M.J. *Textbook of Pharmacology*. Oxford: Blackwell, 1980.

BROSEN, K. Recent developments in hepatic drug oxidation. Implication for clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinets*, v.8, p.220-239, 1990.

De LUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACCI M.; AVELLAR M.C.W. *Farmacologia Integrada*. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

FROMM, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends in Pharmacol Sci.*, v.25, p.423-429, 2004.

GILBALDI, M.; PERRIER, D. *Pharmacokinetics*. 2.ed., New York: Mecel Dekker, 1982.

HANNEMANN, F.; BICHET, A.; EWEN K.M.; BERNHARDT, R. Cytochrome P450 systems – biological variations of electron transport chains. *Biochim Biophys Acta*, v.1770, p.330-344, 2007.

LAMBLE, V.W. (ed). *Drug metabolism and distribution*. Amsterdam: Elsevier, 1983.

MITCHELL, V.R.; HORNING, M.G. *Drug metabolism and Drug Toxiciy*. New York: Raver Press, 1984.

NEBERT, D.E.; GONZALEZ, F.J. Cytochrome P-450 gene expression and regulation. *Trends in Pharmacol. Sci.*, v.16, p.160-164, 1985.

NELSON, D.R.; KAMATAKI, T.; WEXMAN, D.J. The P-450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, acession numbers, early triviale names of enzymes, and nomemclature. *DNA Cell. Biol.*, v.12, n.1, 1993. p.1-51

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R. *Rang & Dale's Pharmacology*. 6th ed., Churchill Livingstone, Elsevier, 2007.

VALLE, L.B.S.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; De LUCIA, R.; OGA, S. *Farmacologia Integrada*. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988.

ZANINI, A.C.; OGA, S. *Farmacologia Aplicada*. 5.ed., São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1994.

# 1.3.

# Toxicodinâmica

*Seizi Oga, Tania Marcourakis* e *Sandra Helena P. Farsky*

## SUMÁRIO

1. Conceitos
2. Agentes tóxicos
3. Seletividade de ação
4. Mecanismos gerais
   4.1. Interações de agentes tóxicos com receptores
   4.2. Interferências nas funções de membranas excitáveis
   4.3. Inibição da fosforilação oxidativa
   4.4. Complexação com biomoléculas
      4.4.1. Componentes enzimáticos
      4.4.2. Proteínas
      4.4.3. Lipídios
      4.4.4. Ácidos nucléicos
   4.5. Perturbação de homeostase cálcica
5. Fatores determinantes da intoxicação
6. Bibliografia

## 1. CONCEITOS

A Toxicodinâmica estuda os mecanismos da ação tóxica exercida por substâncias químicas sobre o sistema biológico, sob os pontos de vista bioquímico e molecular. Desta forma, os dados obtidos são fundamentais para:

1. estimar a possibilidade do agente químico causar efeitos deletérios e qual população pode ser atingida, ou seja, a avaliação do risco;
2. estabelecer procedimentos preventivos e estratégias de tratamentos;
3. desenvolver produtos específicos, com maior seletividade para a espécie de interesse, como por exemplo no caso de pesticidas mais seletivos que não cause toxicidade a seres humanos e animais.

Os dados obtidos também podem ser utilizados como ferramentas científicas. A compreensão dos mecanismos da neurotransmissão e da carcinogênese, por exemplo, foi beneficiada pelo estudo do mecanismo de ação de xenobióticos.

Pelo elevado número de agentes químicos com potencial tóxico, os mecanismos de ação são os mais diversos. Obviamente que o efeito tóxico depende primordialmente do agente químico alcançar e permanecer no sítio de ação. Desta forma, os fatores que facilitam a absorção, a distribuição para o sítio alvo, a biotransformação, caso o agente tóxico seja produto destas reações, ou que impeçam sua eliminação, facilitam o alcance do agente químico no sítio de ação. Neste local, a molécula ativa interage com o sítio molecular por meio de diferentes reações que são determinadas pelas características físico-químicas e estruturais do agente químico e do sítio molecular (Figura 1).

No caso de medicamentos, é importante ressaltar os conceitos de reações adversas e de intoxicação. As reações adversas, não desejadas, são aquelas provocadas com doses terapêuticas do medicamento e ocorrem pelo fato do medicamento nem sempre possuir seletividade para um único alvo molecular ou porque este alvo encontra-se distribuído em diferentes tecidos do organismo. A intoxicação medicamentosa é decorrente de dose excessiva, seja ela acidental ou intencional.

As toxicidades provocadas por xenobióticos podem ser classificadas em agudas e crônicas, conforme o número e a persistência da exposição do sistema biológico ao agente. A intoxicação aguda é decorrente de uma única exposição ou de exposições múltiplas ao agente tóxico, num período de tempo aproximado de 24 horas. Os efeitos surgem de imediato ou no decorrer de alguns dias, no máximo 2 semanas. Experimentalmente, a avaliação da toxicidade aguda de xenobióticos é feita utilizando pelo menos 3 espécies animais, sendo uma não roedora. Geralmente, após a administração de uma única dose, os animais são observados quanto aos sinais e sintomas de intoxicação e o percentual de mortalidade para o cálculo de doses letais. Os parâmetros mais utilizados para expressar o grau de toxicidade aguda de substâncias químicas são a $DL_{50}$ (dose letal 50%) e a $DL_{10}$ (dose letal 10%) que correspondem às doses que provavelmente matam, respectivamente, 50% e 10% de um lote de animais utilizados para os ensaios experimentais. Esses valores são calculados estatisticamente a partir de dados obtidos experimentalmente, correlacionando as doses das substâncias e as mortalidades dos animais, em ensaios denominados quantais.

Além de doses letais, podem se determinar ainda as doses efetivas ou eficazes 50% ($DE_{50}$) ou 90% ($DE_{90}$), que são as doses que promovem efeitos desejados em 50% ou 90%, respectivamente, nos animais submetidos aos ensaios experimentais. Esses valores são freqüentemente utilizados para expressar a eficácia dos medicamentos e sua correlação com as doses letais permite determinar os índices chamados Índice Terapêutico (IT) e Margem de Segurança (MS), que são calculados conforme as expressões:

$$IT = \frac{DL_{50}}{DE_{50}}$$

$$MS = \frac{DL_{10} - DE_{90}}{DE_{90}} \cdot 100$$

Quanto maior é o valor do Índice Terapêutico ou da Margem de Segurança de uma substância, menor será o risco de promover intoxicação.

**Figura 1.** Mecanismos que influenciam a chegada de um xenobiótico no seu local de ação.

A intoxicação crônica resulta de exposições repetidas com o agente tóxico, num período de tempo prolongado, de meses ou anos. Muitos compostos não chegam a causar danos após algumas exposições, porém, em casos de exposições prolongadas, podem promover efeitos lentos e graves, como são os casos de mutagenicidade e carcinogenicidade.

## 2. AGENTES TÓXICOS

Os agentes tóxicos apresentam estruturas químicas das mais variadas e podem ser classificados utilizando-se critérios diferentes, conforme a finalidade de seu estudo. Entre os critérios comumente usados, têm-se por exemplo o químico (aminas aromáticas, hidrocarbonetos halogenados), o físico (gás, líquido e sólido), o bioquímico (inibidor de sulfidrila, causador de metemoglobinemia) e o farmacológico (*d*-tubocurarina, alfa-bungarotoxina – bloqueadores de receptores nicotínicos da acetilcolina; picrotoxina – bloqueador dos canais de cloro GABA-dependente).

A exposição dos seres vivos aos agentes tóxicos ocorre por várias maneiras. A exposição ocupacional se dá geralmente em recintos fechados, como fábricas e armazéns, onde os trabalhadores podem se expor durante período de tempo prolongado às diferentes substâncias, como a metais, inseticidas, herbicidas etc. A exposição também pode ocorrer pelo meio ambiente, uma vez que em grandes cidades, onde existem inúmeras fábricas e intensa circulação de carros movidos à gasolina e diesel, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e o monóxido de carbono são poluentes do ar atmosférico. Outro tipo de intoxicação é a causada por medicamentos, que é decorrente não só pela exposição ao princípio ativo, mas também pela presença de excipientes e solventes que podem promover efeitos indesejáveis. O mesmo pode acontecer com a exposição a alimentos e bebidas populares que contêm substâncias ativas do tipo etanol, xantínicos, flavorizantes, além de corantes e conservantes, muitas vezes responsáveis pelos efeitos tóxicos.

## 3. SELETIVIDADE DE AÇÃO

Todas as substâncias químicas tóxicas produzem seus efeitos alterando as condições fisiológicas e bioquímicas normais das células.

Alguns compostos do tipo ácido ou base atuam indistintamente sobre qualquer órgão, causando irritação e corrosão nos tecidos de contato. Outros compostos são mais seletivos no seu modo de ação e causam danos a um tipo de órgão ou estrutura, chamado estrutura-alvo, sem lesar outros. Essas estruturas-alvo freqüentemente são moléculas protéicas que exercem importantes funções no organismo tais como enzimas, moléculas transportadoras, expressão gênica, canais iônicos e receptores.

As diferenças fisiológicas e bioquímicas existentes entre as espécies animais determinam também variação de seletividade de ação de xenobióticos. Na agricultura, por exemplo, usam-se pesticidas seletivos para combater certos fungos e insetos, sem causar danos significativos às outras espécies vivas. Ademais, a toxicidade seletiva de certos inseticidas, usados em forma de *spray*, reside no fato de os insetos absorverem maior quantidade do agente do que o homem, pela sua maior área de superfície de contato em relação à sua massa corporal.

Na medicina, os antibióticos são úteis pela toxicidade seletiva que eles possuem sobre os microorganismos causadores da doença. As penicilinas e as cefalosporinas agem seletivamente sobre as paredes celulares presentes nas bactérias, mas ausentes nas células animais. Ainda, a seletividade pode ser resultado da diferença bioquímica entre dois tipos celulares. Exemplificando esta afirmação, as bactérias não absorvem ácido fólico, mas sintetizam-no a partir do ácido *p*-aminobenzóico, ácido glutâmico e pteridina, enquanto que os mamíferos não sintetizam o ácido fólico, mas o retiram de sua dieta. As sulfonamidas são seletivamente tóxicas às bactérias, por competirem com o ácido *p*-aminobenzóico na incorporação deste na molécula do ácido fólico.

Outro ponto de seletividade de agentes químicos capazes de levar à toxicidade é a diferença entre o conteúdo de enzimas de biotransformação. Os ratos, por exemplo, desenvolvem tumor no fígado com doses de aflatoxina $B_1$, uma toxina de fungo, que não provocam o mesmo efeito em camundongos. Este fato é decorrente dos camundongos possuírem maiores concentrações da enzima glutationa S-transferase, responsável pela conjugação do metabólito oxidado da aflatoxina $B_1$ (epóxido), que é carcinogênico.

Alguns agentes químicos, por características físico-químicas, possuem seletividade específica para determinados tecidos onde se acumulam (tecidos de depósito). É o caso do flúor, que em concentrações acima das permitidas, interage com a matriz óssea, conferindo fragilidade ao tecido (fluorose).

É importante ressaltar que a intensidade da intoxicação depende também do tecido atingido. Os tecidos epiteliais, incluindo o fígado, têm capacidade de regeneração na resposta a uma perda de sua massa tecidual, enquanto outros tecidos, como células nervosas, possuem capacidade de regeneração mais limitada. Ademais, a maioria dos órgãos tem

a capacidade de funcionamento que excede aquela requerida para homeostase normal, denominada de capacidade funcional de reserva. Por exemplo, um indivíduo pode viver bem após a retirada de um dos rins ou remoção da parte de seu pulmão, ou mesmo com a metade de sua quantidade de hemoglobina. Esse excesso funcional constitui um elemento crítico na capacidade do organismo sobreviver às graves agressões de agentes tóxicos.

## 4. MECANISMOS GERAIS

O entendimento do mecanismo molecular e bioquímico de agentes tóxicos bem como do local específico de sua ação é de capital importância para a aplicação de medidas preventivas e terapêuticas de intoxicação. Os mecanismos gerais mais conhecidos podem ser descritos conforme seguem.

### 4.1. Interações de agentes tóxicos com receptores

Os receptores são elementos sensoriais no sistema de comunicações químicas que coordenam a função de todas as células no organismo. São constituídos por macromoléculas ou parte delas, situadas nas membranas celulares, no citoplasma ou no núcleo. Fisiologicamente, a estimulação de receptores é feita por um agonista que promove efeitos biológicos característicos. As respostas desencadeadas pelos órgãos são rápidas ou lentas, dependendo da estrutura molecular e dos mecanismos de transdução envolvidos. Por exemplo, os receptores nicotínicos da acetilcolina, o receptor GABA e o receptor do glutamato desenvolvem respostas rápidas por ativarem canais iônicos constitutivos, enquanto os receptores de hormônios, os muscarínicos da acetilcolina e os adrenérgicos causam efeitos relativamente lentos por levarem à ativação de segundos mensageiros necessários para a transdução do sinal.

A ligação entre o receptor e o ligante é normalmente reversível e pode ser descrita pela expressão:

$$R + S \leftrightarrows RS \qquad (1)$$

A constante de dissociação do complexo formado pode ser expressa como:

$$Kd = k1/k2 = [R]\,[S] / [RS] \qquad (2)$$

onde [R], [S] e [RS] representam, respectivamente, as concentrações do receptor livre, do agente ligante e do receptor complexado com o ligante. O ligante, naturalmente, pode ser uma substância endógena que interage com o receptor para produzir uma resposta fisiológica normal, ou pode ser uma substância exógena que promova ativação (agonista) ou bloqueio (antagonista) da resposta.

O número total de receptores pode ser escrito:

$$[R]t = [RS] + [R] \qquad (3), \text{ portanto,}$$

$$[R] = [R]t - [RS] \qquad (4),$$

substituindo a relação (4) na expressão (2) e efetuando rearranjo, obtém-se:

$$[RS] / [R]t = [S] / Kd[S]$$

A relação [RS]/[R]t representa a fração de receptores que está ocupada pelo ligante quando está presente o toxicante na concentração [S]. Se o efeito (E) resultante da interação entre ligante (S) e o receptor (R) é dependente da fração de receptores ocupados pelo ligante, a magnitude de resposta pode ser descrita:

$$E = [S] / Kd[S]$$

ora, esta equação expressa uma função hiperbólica e é a base da cinética de Michaelis-Menten, descrita para interação enzima-substrato. Essas ligações possuem alta estéreo-seletividade de ação e qualquer alteração estrutural do ligante tende a modificar ou abolir o efeito.

Por exemplo, a atropina e a escopolamina ligam-se ao receptor muscarínico nos sistemas nervosos central e autônomo bloqueando a ação da acetilcolina. Os receptores nicotínicos da acetilcolina situados nos gânglios são bloqueados pelo hexametônio, enquanto que os situados na placa terminal da junção neuromuscular são bloqueados pelo decametônio e *d*-tubocurarina. Em todos esses exemplos, os ligantes exógenos bloqueiam a ação da acetilcolina que é o mediador fisiológico normal nesses sítios de ação. A *d*-tubocurarina, um alcalóide extraído de várias plantas da América do Sul, é um potente bloqueador da musculatura estriada. É encontrada juntamente com outros alcalóides, cuja mistura é conhecida como curare e é utilizada como veneno nas flechas pelos índios. A *d*-tubocurarina, assim como os fármacos sintetizados posteriormente para uso clínico, possuem estrutura com amônio quaternário que dificulta sua absorção pelo tubo digestivo. Na junção neuromuscular, esses compostos atuam como antagonistas competitivos de acetilcolina; suas moléculas se ligam aos receptores nicotínicos da placa terminal, mas são incapazes de desencadear o processo de despolarização. Os músculos estriados, portanto, tornam-se flácidos, progressivamente, os primeiros a serem afetados são os músculos frágeis da face evoluindo para os mais potentes, dos membros e do tronco. Os músculos respiratórios são os últimos a

serem afetados e os primeiros a se recuperarem após a suspensão da ação do curare. Mesmo durante a curarização total, o indivíduo mantém a consciência e a percepção da dor, pois a *d*-tubocurarina não atinge o sistema nervoso central nem afeta o limiar à dor.

A nicotina proveniente do cigarro, em baixas concentrações, estimula os receptores de acetilcolina pós-sinápticos, situados nos gânglios, simpáticos e parassimpáticos, nas placas terminais de junções neuromusculares e nas supra-renais. No plano ganglionar, a nicotina provoca efeito estimulante de todos os órgãos autonômicos, tais como o coração, vasos e trato digestivo. Daí o efeito nocivo, por exemplo, em portadores de hipertensão arterial. Em concentrações elevadas, a nicotina pode causar despolarização persistente de membranas das fibras pós-sinápticas e depressão dos órgãos inervados.

## 4.2. Interferências nas funções e membranas excitáveis

A manutenção e a estabilidade das membranas excitáveis são essenciais à fisiologia normal dos tecidos. As substâncias químicas podem alterar a função das membranas por vários meios. Por exemplo, o fluxo de íons através de axônio neuronal pode ser bloqueado pelas substâncias que agem como bloqueador do canal de íons. É o caso do bloqueio de canais envolvidos na liberação de acetilcolina nas terminações do axônio neuronal, que medeia as contrações dos músculos esqueléticos, entre outros efeitos. Nesse processo de transmissão de informação nervosa para as fibras musculares, a liberação de acetilcolina é precedida de vários eventos físico-químicos, caracterizados pela entrada de íons sódio e saída de potássio através de membranas. A tetrodotoxina, derivada de gônadas, fígado e pele de peixe da família *Tetrodontidae*, bloqueia os canais de sódio, situados nas membranas axônicas, impedindo as trocas iônicas e liberação de acetilcolina. No Japão, a espécie de peixe conhecida como *fugu*, portadora de tetrodotoxina, é consumida em larga escala, principalmente em restaurantes especializados. Desta forma, sua preparação requer treinamento especial, mas, mesmo assim, tem havido alguns acidentes fatais.

No Brasil há uma espécie de peixe chamada *baiacu*, facilmente reconhecido, pois ele se insufla quando ameaçado, adquirindo uma forma esférica. Esta espécie possui tetrodotoxina e a intoxicação tem como conseqüência uma acentuada fraqueza muscular que evolui para paralisia completa e morte.

O veneno de sapo, a batrocotoxina, encontrado na pele de anfíbio sul-americano *Phyllobates aurotaenia* aumenta a permeabilidade das membranas em repouso aos íons sódio. As células das membranas tornam-se inicialmente hiperexcitáveis e o potencial de ação é prolongado; em seguida, elas se tornam despolarizadas e inexcitáveis. Nas células do miocárdio os efeitos são extra-sístoles e outras arritmias, culminando em fibrilação. Da mesma forma atuam o alcalóide aconitina, a veratridina, os inseticidas organoclorados e as piretrinas.

As toxinas botulínicas produzidas pelo microorganismo *Clostridium botulinum* complexam-se irreversivelmente ao axônio terminal colinérgico e bloqueiam a liberação de acetilcolina. O botulinismo resulta da ingestão de alimento enlatado, contaminado com o microorganismo e caracteriza-se por paralisia parassimpática e motora progressiva, por boca seca, turvação da visão e dificuldade de deglutir, seguida por paralisia respiratória.

A β-bungarotoxina é uma proteína contida no veneno de várias espécies de serpentes da família Naja e possui ação semelhante à da toxina botulínica. O mesmo veneno contém outra toxina ativa, a α-bungarotoxina, que bloqueia os receptores da acetilcolina pós-sinápticos, causando paralisia muscular nos animais intoxicados.

Existem outras toxinas polipeptídicas que atuam de forma muito seletiva sobre os canais de potássio, dependente de cálcio, nas membranas celulares de músculos lisos e fígado. São exemplos, a apamina, isolada do veneno de abelha, a caribdotoxina, do veneno de escorpião e a dendrotoxina, do veneno de serpente *mamba verde*.

Muitos solventes orgânicos produzem efeitos depressores no sistema nervoso central por alterarem a fluidez de membranas, em face de sua propriedade lipofílica, tornando-a mais densa e rígida e comprometendo vários processos que necessitam mudanças rápidas e reversíveis na estrutura da membrana. O álcool fluidifica as membranas, dissolvendo o componente lipídico e diminuindo a viscosidade. Com o tempo, a membrana celular torna-se mais rígida e menos sensível ao efeito fluidificante do álcool.

## 4.3. Inibição da fosforilação oxidativa

Há muitas substâncias químicas capazes de desenvolver efeitos adversos interferindo com a oxidação de carboidratos na síntese de Adenosina Trifosfato (ATP). Essa interferência pode ocorrer por bloqueio do fornecimento de oxigênio aos tecidos. Por exemplo, a oxidação de ferro na hemoglobina (metemoglobina) pelos nitritos também interfere com o fornecimento de oxigênio, uma vez que a metemoglobina não consegue transportar moléculas de oxigênio. A utilização de oxigênio pelos tecidos é bloqueada pelo cianeto, sulfeto e azida, por causa da sua afinidade ao citocromo oxidase.

A formação final de ATP, via oxidação de carboidratos, pode ser bloqueada também em outros locais. Por exemplo, a rotenona e a antimicina A interferem com enzimas específicas na cadeia transportadora de elétrons; os nitrofenóis desacoplam a fosforilação oxidativa e o fluoroacetato de sódio inibe o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (ciclo de Krebs).

As conseqüências da depleção do ATP são muitas e incluem efeitos tais como interferência com a integridade da membrana, o funcionamento de bombas iônicas e a síntese protéica. A depleção significante de energia, inevitavelmente, levará à perda de funções celulares. O desacoplamento aumenta o consumo de oxigênio e produção de calor. Observam-se, no homem, hipertermia, estimulação respiratória e circulatória, náusea, sudorese e coma.

## 4.4. Complexação com biomoléculas

**4.4.1. Componentes enzimáticos.** Entre os agentes tóxicos que atuam inibindo as enzimas estão os inseticidas organofosforados, N-metilcarbamato, cianeto, azatioprina.

Os inseticidas fosforados inativam às enzimas colinesterases e, em conseqüência, reforçam os efeitos da estimulação dos nervos colinérgicos pela acetilcolina endógena. As colinesterases possuem dois centros ativos, que são o centro aniônico, responsável pela ligação eletrostática do grupamento trietilamônio da acetilcolina, e o centro esterásico, que possui uma hidroxila pertencente à serina e que se liga ao carbono da carboxila da acetilcolina. Após esta ligação, há liberação de colina, seguida da inclusão de uma molécula de água no complexo, liberando, nesta etapa, o ácido acético e a enzima regenerada. Os grupamentos fosfatos dos inseticidas fosforilam o sítio esterásico, tornando a regeneração da enzima extremamente lenta, razão pela qual esta inibição é considerada irreversível. A função enzimática, portanto, fica na dependência da nova síntese de enzimas e os efeitos tóxicos são decorrentes do acúmulo da acetilcolina nas terminações nervosas.

Outro xenobiótico que atua sobre componentes enzimáticos é o cianeto que atua sobre o sistema responsável pela respiração tecidual nas mitocôndrias. Sua ação se faz na cadeia transportadora de elétron, complexando com *heme* do citocromo oxidase ou citocromo a3, incapacitando-o de fixar o oxigênio. A morte celular é ocasionada pela inibição do aproveitamento de oxigênio, conseqüente ao bloqueio da transferência de elétrons do citocromo a3 para o oxigênio molecular.

Alguns metais são inibidores enzimáticos, exercendo desta forma, suas ações tóxicas. O chumbo, mercúrio, cádmio e arsênio se complexam com grupos sulfidrilas de proteínas, causando também lesão celular. Adicionalmente, o chumbo e o mercúrio, bem como certos hidrocarbonetos halogenados (hexaclorobenzeno), inibem enzimas específicas para a síntese do grupamento heme e as manifestações resultantes são as porfirias. Metais do tipo cobalto, berílio, cádmio e lantanídeos praseodímio são inibidores de diferentes isoenzimas do citocromo P-450 e podem interferir na biotransformação de xenobióticos lipofílicos, retardando sua eliminação.

O monóxido de carbono, gás liberado da combustão incompleta da matéria orgânica, se fixa à forma reduzida do ferro na hemoglobina, reduzindo o transporte de oxigênio aos tecidos, além de combinar-se com o citocromo oxidase.

**4.4.2. Proteínas.** Como já amplamente discutido no capítulo de Toxicocinética, os metabólitos resultantes das reações de fase I da biotransformação são, geralmente, intermediários eletrofílicos que interagem covalentemente com os sítios nucleofílicos das macromoléculas celulares, tais como proteínas, polipeptídios, RNA e DNA. Essas ligações com os constituintes celulares podem dar início de processos tóxicos como mutagenicidade, carcinogenicidade e necrose. Desta forma, vale ressaltar que inibidores e indutores das enzimas de fase I podem contribuir para a toxicidade de xenobióticos.

Uma vez que as reações de fase II são, na maioria das vezes, de inativação por conjugarem os metabólitos eletrofílicos com substratos endógenos para a excreção, a saturação das enzimas ou a depleção dos substratos endógenos podem levar à toxicidade.

Estas afirmações são ilustradas pelos seguintes exemplos:

a) *Aflatoxina $B_1$*. A aflatoxina $B_1$ é uma das micotoxinas produzidas pelos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Essa substância exerce alta hepatotoxicidade e hepatocarcinogenicidade, por meio de seu metabólito ativo, o 2,3-epóxido, que se liga covalentemente ao DNA. A toxicidade da aflatoxina B1 depende da velocidade com que o organismo a metaboliza pelas monooxigenases do citocromo P-450. Há uma variação significativa entre as espécies animais na quantidade de formação de metabólito reativo e inativação do mesmo. Os ratos metabolizam aflatoxina rapidamente em relação aos camundongos, coelhos e aves. Ainda, a conjugação com a glutationa, mediada pela glutationa S transferase é menor em ratos se comparada a camundongos.

b) *2-naftilamina*. Este composto sofre inicialmente N-hidroxilação sob ação do citocromo

P-450 dando metabólito carcinogênico. A segunda fase é a conjugação glicurônica e, neste caso, o metabólito resultante é desprovido de toxicidade. No entanto, na fase de excreção renal, o conjugado sofre ação de beta-glicoronisades na bexiga formando o íon arilnitrenium reativo, capaz de interagir com radicais nucleofílicos. Este é mecanismo proposto para o maior número de casos de câncer na bexiga em trabalhadores expostos ao solvente.

c) *Paracetamol.* O paracetamol é oxidado, na primeira fase da reação, catalisada pelo citocromo P-450, e conjugado, na segunda fase, com sulfato ou ácido glicurônico. O metabólito tóxico responsável pela necrose hepática, provavelmente é uma quinoneimina que é ligada à glutationa. Esse fato é evidenciado pela significativa depleção de glutationa e pelo concomitante aumento de hepatotoxicidade após administração de dose elevada de paracetamol em ratos.

d) *Outros.* Cloranfenicol, fenilbutazona, bromobenzeno e tetracloreto de carbono provocam efeitos tóxicos por mecanismos semelhantes. Os grupos reativos resultantes de sua biotransformação reagem com macromoléculas teciduais de diversos órgãos. A anemia aplástica conseqüente ao uso prolongado de cloranfenicol pode estar relacionada à atuação de metabólito ativo do fármaco sobre a medula óssea. O bromobenzeno e o tetracloreto de carbono lesam o tecido hepático, especialmente na região onde há maior localização das enzimas de fase I responsáveis pelas biotransformações. A reserva de glutationa no fígado de animais tratados com essas substâncias é reduzida, mostrando seu importante papel na inativação dos metabólitos.

**4.4.3. Lipídios.** Embora alguns dos processos discutidos acima sejam capazes de produzir respostas adversas sem a morte das células, outros, eventualmente, levam à perda de função do órgão e até à morte celular. Isto ocorre principalmente quando a exposição ao toxicante se faz cronicamente, onde danos teciduais são cumulativos após repetidos episódios citotóxicos. Um dos principais mecanismos de morte celular é a peroxidação lipídica, que compreende uma série de reações químicas envolvendo a deterioração oxidativa dos ácidos graxos poliinsaturados, que pode romper as estruturas celulares e destruí-las.

A seqüência específica de eventos que causam danos celulares e morte é complexa e envolve vários mecanismos, entre os quais a necrose e a apoptose. Na maioria das vezes, os metabólitos eletrofílicos formados a partir da bioativação dos agentes químicos iniciais são os responsáveis pelo desencadeamento do processo que pode gerar a morte celular. Exemplificando esta afirmação, o metabólito intermediário do tetracloreto de carbono, triclorometil, induz peroxidação lipídica e subseqüente destruição dos componentes celulares. Sua formação pode ocorrer por oxidação de um ou dois elétrons, mediada por enzimas, bem como por autoxidação de pequenas moléculas, tais como flavinas reduzidas e tióis. A transferência de elétrons de metais de transição do tipo ferro, para moléculas contendo oxigênio também pode dar início a reações de radical livre.

O processo de peroxidação lipídica pode ser visto em detalhes no capítulo de Radicais Livres e Antioxidantes.

**4.4.4. Ácidos nucléicos.** Há numerosos sítios nucleofílicos na molécula do DNA que podem prontamente reagir com agentes eletrofílicos, proveniente, muitas vezes, da reação de fase I da biotransformação. Por exemplo, a alquilação na posição O-6 da guanina na cadeia do DNA parece ser crítico para mutagenicidade e carcinogenicidade causadas por nitrosaminas. Entretanto, a ligação de agentes eletrolíticos a outros sítios, tais como as posições N-7, N-2 e C-2 da guanina, também é relevante.

A ligação do DNA a substâncias exógenas altera a expressão de produtos gênicos essenciais e necessários para a sobrevivência celular, podendo causar a morte ou desencadear uma série complexa de eventos, dando origem, por exemplo, ao câncer. No entanto, existem mecanismos de reparos intracelulares que podem reverter estas alterações. Se estas reversões forem eficazes, o dano ao DNA será eliminado e a célula sobreviverá sem seqüelas. Mas algumas podem escapar do reparo ou são reparadas incorretamente, permitindo a introdução do gene com a mutação e a sua propagação. Se a mutação ocorre numa célula somática, a lesão genética não pode ser passada para futuras gerações, mas serviria como precursora para o desenvolvimento eventual de câncer.

Para maiores detalhes dos mecanismos envolvidos nas lesões ao DNA ver capítulo de Mutagênese e Carcinogênese.

As interações covalentes de substâncias eletrofílicas com RNA, que também possui sítios nucleofílicos, podem perturbar suas funções intracelulares básicas, como, por exemplo, a síntese protéica.

## 4.5. Perturbação de homeostase cálcica

O cálcio funciona como segundo mensageiro na regulação de muitas funções intracelulares vitais

para as células, entre as quais ativação e inativação de uma série de enzimas; organelas intracelulares, microfilamentos, entre outros. Por exemplo, a organização de citoesqueleto normal é perturbada quando o cálcio intracelular aumenta, em função da dissociação de microfilamentos da actina e ativação de fosfolipases e proteases. Embora normalmente a ativação de fosfolipases mediada pelo cálcio desempenhe uma função protetora pela remoção de fosfolipídios peroxidados de membranas lesadas, quando ativadas pelas mudanças não fisiológicas na concentração de cálcio, as fosfolipases aumentam a quebra de fosfolipídios da membrana e podem levar ao dano ou à morte celular.

A alteração na homeostase cálcica intracelular resulta do elevado influxo de cálcio, liberação de íon cálcio de estoque intracelular e inibição de seu efluxo pela membrana plasmática. A interferência nestes processos é um mecanismo importante na ação de agentes tóxicos, entre os quais nitrofenóis, quinonas, peróxidos, aldeídos, dioxinas, alcanos e alcenos halogenados e alguns íons metálicos. Pela grande importância do cálcio nas inúmeras atividades intracelulares, os danos acarretados pela alteração na sua concentração dentro da célula são os mais diversos dependendo do tecido em questão.

## 5. FATORES DETERMINANTES DA INTOXICAÇÃO

Todos os efeitos tóxicos são conseqüentes das alterações fisiológicas e bioquímicas normais dos órgãos. A morte celular induzida num órgão por dano químico, dependendo de sua extensão, pode conduzir à falência desse órgão, mas pode também não causar nenhuma repercussão clínica significativa.

De regra, a extensão da lesão é diretamente proporcional à concentração do agente tóxico, exceto para algumas reações do tipo de sensibilização em que a concentração do agente alergênico é pouco relevante. Portanto, a toxicocinética, a par da potência de cada agente, constitui um dos fatores decisivos no desencadeamento dos fenômenos de intoxicação (Figura 1).

A toxicocinética, por sua vez, é dependente de inúmeros fatores, entre os quais, a via de acesso do agente ao organismo, suas propriedades físico-químicas e do estado fisiopatológico do indivíduo exposto, particularmente no que tange às funções cardíacas, hepáticas e renais. A insuficiência cardíaca reduz a circulação do sangue nos órgãos e, conseqüentemente, prejudica a distribuição de substâncias. Problemas hepáticos e renais interferem decididamente na eliminação de toxicantes, respectivamente, por meio de biotransformação e excreções.

A gravidade do efeito tóxico, por outro lado, varia muito conforme o órgão afetado. Naturalmente, o efeito é grave quando o órgão afetado desempenha uma função vital no organismo. Além disso, alguns órgãos possuem a capacidade regeneradora, após sofrerem agressões e perda da massa tecidual, enquanto outros, como o tecido nervoso possui menor capacidade de regeneração.

A elucidação dos mecanismos básicos da toxicidade, assim como estudos sobre os fatores que modificam a intensidade dos efeitos tóxicos de xenobióticos são essenciais à Toxicologia. A utilização desses conhecimentos para o desenvolvimento de antídotos e das medidas preventivas racionais, para evitar a intoxicação, constitui as principais metas dos profissionais envolvidos em investigações toxicológicas.

## 6. BIBLIOGRAFIA


CRAIG, C.R.; STITZEL, R.E. (Ed.). *Modern Pharmacology*. Boston: Little Brown, 1990.

De LUCIA, R.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; PLANETA, C.S.; GALLACCI M.; AVELLAR M.C.W. *Farmacologia Integrada*. Rio de Janeiro: Revinter, 2007.

GREGUS, Z.; KLAASSEN, C.D. Mechanism of toxicity. In: Klassen, C.D. (Ed.), *Casarett and Doull's* Toxicology. *The Basic Science of Poisons*. 6.ed., New York: Pergamon, 2001.

HAYES, W. J.; LAW, E.R. (Ed.). *Handbook of Pesticide Toxicology*. New York: Academic, 1991.

KONG, A-N.T.; MANDLEKAR, S.; YU, R.; LEI, W.; FASANMANDE, A. Pharmacodynamics and toxicodynamics of drug action: signaling in cell survival and cell death. *Phamaceutical Research*, v.16, p.790-798, 1999.

LEVIE, R.R. (Ed.). *Pharmacology: Drug Actions and Reactions*. Boston: Little Brown, 1990.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R. *Rang & Dale's Pharmacology*. 6.ed., Churchill Livingstone, Elsevier, 2007.

VALLE, L.B.S.; OLIVEIRA-FILHO, R.M.; De LUCIA, R.; OGA, S. (Ed.). *Farmacologia Integrada*. Vol. 1. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu, 1988.

ZANINI, A.C.; OGA, S. (Ed.). *Farmacologia Aplicada*. 5.ed., São Paulo: Atheneu Editora São Paulo, 1994.

# 1.4.

# Radicais Livres e Antioxidantes

*Dulcineia Saes Parra Abdalla* e *Luciane Aparecida Faine*

## SUMÁRIO

1. Introdução
2. Radicais livres e espécies reativas de oxigênio
   2.1. Fundamentos
   2.2. Geração de espécies reativas em sistemas biológicos
3. Antioxidantes e sistemas de defesa antioxidante
   3.1. Enzimas antioxidantes
   3.2. Ascorbato
   3.3. Glutationa
   3.4. Tioredoxinas
   3.5. Melatonina
   3.6. Metalotioneínas
   3.7. Antioxidantes lipossolúveis
   3.8. Antioxidantes dos fluidos extracelulares
   3.9. Sistemas de reparo
4. Estresse oxidativo
   4.1. Conceito
   4.2. Condições clínicas associadas ao estresse oxidativo
5. Estratégias de intervenção terapêutica
   5.1. Compostos seqüestradores de radicais livres como potenciais agentes terapêuticos
   5.2. Antioxidantes enzimáticos
   5.3. Outros fármacos
6. Bibliografia

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO) participam de inúmeros processos fisiológicos, incluindo crescimento celular normal, morte celular programada e senescência celular. Portanto, os radicais livres têm um papel fisiológico na sinalização celular redox. Apesar de serem essenciais para as respostas biológicas, em algumas ocasiões, o aumento na produção dessas espécies pode resultar em respostas deletérias ao organismo.

Os radicais livres têm sido implicados em numerosas doenças que afetam o ser humano, indicando que estas espécies, provavelmente, não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos. As espécies radicalares participam tanto das reações inflamatórias como também de mecanismos de transdução de sinal, atuando como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Portanto, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo deve ser finalmente regulado de modo que as reações e processos metabólicos dependentes delas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células. O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos, devido à menor formação ou ao maior consumo, ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar inclusive na morte celular.

Em muitas doenças, a natureza da espécie radicalar que amplifica a lesão primária não é conhecida, tornando difícil o planejamento correto de fármacos com propriedades antioxidantes que eliminem diretamente o radical livre, impedindo sua reação com alvos celulares, ou que interrompam as cadeias radicalares evitando, assim, a propagação das lesões. O planejamento adequado destes fármacos e das estratégias terapêuticas depende de diversos fatores, tais como: entendimento dos processos dependentes dos radicais livres envolvidos na fisiopatologia dos diversos processos e doenças; identificação das fontes celulares geradoras das espécies radicalares potencialmente tóxicas; e identificação dos compostos que possam atuar como antioxidantes, bem como a sua distribuição tecidual, localização subcelular e mecanismo de ação. Quanto maior o conhecimento destes fatores, melhores serão as condições de planejamento e utilização das estratégias de intervenção que poderão suprimir ou reverter os efeitos lesivos dos radicais livres no organismo.

## 2. RADICAIS LIVRES E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

### 2.1. Fundamentos

Radical livre é qualquer espécie química capaz de existir independentemente, que contenha um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. Em geral, essas espécies são instáveis, têm uma meia-vida muito curta (podendo variar desde nanosegundos a alguns minutos) e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares. Os radicais livres podem ser formados pela perda ou adição de um único elétron a um composto não radicalar. Eles podem ser formados, por exemplo, na fissão homolítica de uma ligação química covalente, se cada um dos elétrons compartilhados na ligação (representados por ••) permanecer em cada um dos átomos que participam da ligação, ex.:

$$A \bullet\bullet B \rightarrow A\bullet + B\bullet$$

assim, formam-se dois radicais livres, ou seja, os radicais A• e B• (o ponto é utilizado para representar um radical livre). Na radiólise da água, por exemplo, formam-se espécies radicalares, tais como o radical hidroxila (•OH):

$$H_2O \rightarrow H_3O^{-}\ aq,\ e^{-}\ aq,\ H\bullet,\ \bullet OH,\ H_2O_2,\ H_2$$

No entanto, na fissão heterolítica não são formados radicais livres, pois um dos átomos recebe ambos os elétrons quando ocorre a cisão da ligação covalente:

$$A \bullet\bullet B \rightarrow A\bullet\bullet + B^{-}$$

o elétron extra confere a A uma carga negativa, ficando o átomo B com uma carga positiva, os quais são, respectivamente, ânion e cátion. Assim, na fissão heterolítica da água, formam-se o ânion hidroxila ($OH^{-}$) e o íon hidrogênio ($H^{+}$).

O elétron livre, que caracteriza o radical livre, pode estar centrado em um átomo de oxigênio, nitrogênio, carbono ou enxofre. Na natureza existem substâncias que são radicais livres, como o oxigênio no estado fundamental ($O_2$) e o óxido nítrico (•NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células do organismo, sendo, atualmente, identificado como fator de relaxamento dependente do endotélio (EDRF).

Pelo fato da molécula de oxigênio ser um bi-radical (possuir dois elétrons livres nos orbitais $\pi$ antiligantes), o oxigênio só pode reagir com moléculas

com configuração eletrônica semelhante. Como a maioria das biomoléculas não são bi-radicais, o oxigênio fica impedido (por restrição de *spin*) de reagir com as mesmas, evitando assim que alvos celulares importantes sejam lesados. No entanto, o oxigênio pode dar origem a diversas espécies reativas, seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. Assim, quando o oxigênio no estado fundamental absorve energia formam-se as espécies eletronicamente excitadas denominadas oxigênio singlete ($^1O_2$) delta e sigma (respectivamente, 22,4 Kcal e 37,5 Kcal a mais que o oxigênio no estado fundamental). Nessas formas de oxigênio singlete a restrição de spin desaparece, o que lhes confere um maior poder oxidante. Uma outra via de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio (em 4 etapas de um elétron) promove o aparecimento do radical superóxido ($O_2^-$), do peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$) e do radical hidroxila (•OH), conforme o esquema abaixo:

$$O_2 \xrightarrow{e^-} O_2^- \xrightarrow[H^+]{e^-} H_2O_2 \xrightarrow[H^+]{e^-} {}^{\bullet}OH \xrightarrow{e^-} H_2O$$

Portanto, a toxicidade do oxigênio decorre da formação destas espécies reativas que podem interagir com diversas biomoléculas e lesar diferentes estruturas celulares. Em condições normais, a concentração destas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem, ou impedem sua formação.

## 2.2. Geração de espécies reativas em sistemas biológicos

As espécies reativas de oxigênio são geradas no citoplasma, mitocôndrias, retículo endoplasmático, membrana celular e núcleo de todas as células aeróbicas. A seguir, serão descritos alguns processos responsáveis pela geração das diferentes espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de natureza radicalar e não radicalar.

***Oxigênio Singlete*** ($^1O_2$). A excitação do oxigênio no estado fundamental triplete ($^3O_2$) ao seu estado singlete ($^1O_2$) requer energia térmica ou fotoquímica e pode ocorrer quando vários pigmentos (sensibilizadores) são iluminados na presença de ($^3O_2$). Os sensibilizadores no estado excitado triplete podem decair ao estado fundamental por interações vibracionais com o solvente, eliminação de calor ou transferência de energia. Quando algumas substâncias sensibilizadoras, tais como clorofila, bilirrubina, retinal e porfirinas são irradiadas com luz de comprimento de onda adequado, estas são excitadas ao estado triplete e posteriormente transferem esta energia de excitação ao oxigênio fundamental triplete, convertendo-o a oxigênio singlete (reação tipo II). Os sensibilizadores eletronicamente excitados também podem participar de reações de transferência de elétrons, gerando radicais livres (reações tipo I).

Os sensibilizadores no estado excitado triplete, assim com o oxigênio singlete, podem reagir com outras moléculas produzindo efeitos fotodinâmicos. Essas reações de fotossensibilização são importantes em diversas situações biológicas. O retinal, contido na rodopsina presente na retina, pode sensibilizar a produção de oxigênio singlete, o que contribuiria para o aparecimento das lesões que ocorrem por exposição prolongada dos bastonetes da retina à luz com comprimento de onda absorvido pela rodopsina. A fotossensibilidade observada em pacientes com porfirias cutâneas é decorrente da ação fotossensibilizante das porfirinas, sendo a severidade deste efeito depen-

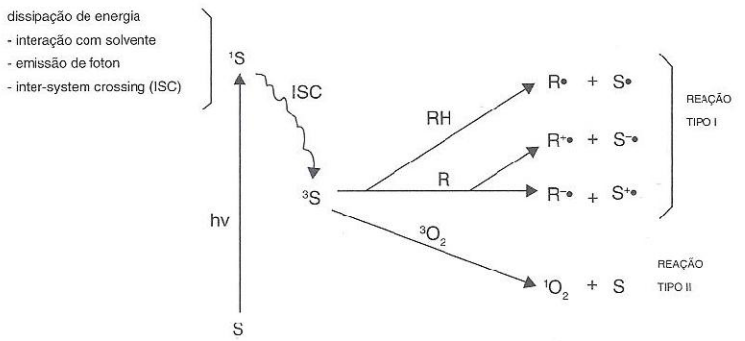



**Figura 1.** Representação esquemática das reações envolvidas nas oxidações fotossensibilizadas dos tipos I e II. A espécie excitada triplete ($^1S$) pode dissipar energia por interação com o solvente, emissão de fótons ou através do processo de inter-system crossing (ISC), formando a espécie excitada triplete ($^3S$), que poderá interagir com diversas substâncias (R ou RH), através da transferência de elétrons (reação do tipo I), ou com o oxigênio no estado fundamental triplete ($^3O_2$), formando o oxigênio singlete ($^1O_2$) e a substância S no estado fundamental (reação do tipo II).

dente da estrutura da porfirina acumulada, a qual difere nos diversos tipos de porfirinas. Alguns efeitos fotoquímicos são utilizados em medicina na terapia fotodinâmica como, por exemplo, no tratamento de lesões cutâneas causadas por *Herpes simplex*, no tratamento da *psoríase* pelo *psoraleno* e na fototerapia de neonatos ictéricos. Neste último caso, a irradiação promove uma fotoisomerização da molécula de bilirrubina, promovendo a formação de derivados (fotoisômeros) mais hidrossolúveis que são facilmente excretados. O fato do oxigênio singlete participar deste mecanismo de destruição da bilirrubina tem preocupado os neonatologistas, que têm procurado utilizar luz com comprimentos de onda mais adequados no sentido de minimizar a formação de fotoisômeros que possam apresentar efeitos tóxicos. O oxigênio singlete também está envolvido na destruição das células tumorais por derivados de hematoporfirina e na fototoxicidade de algumas fenotiazinas, tetraciclinas e do benoxaprofeno. Em alguns sistemas enzimáticos (lactoperoxidase, mieloperoxidase, peroxidases presente na tireóide e útero) e no processo da peroxidação de lipídeos também ocorre a geração de oxigênio singlete.

As perspectivas são de que o oxigênio singlete também possa atuar nas vias de sinalização celular, uma vez que promove a oxidação direta de outras moléculas sinalizadoras. Produtos de oxidação formados no ambiente de geração de oxigênio singlete se difundem e também podem reagir com moléculas sinalizadoras. Outro mecanismo é a alteração do balanço redox da célula para um estado mais oxidado, levando à oxidação da maior parte dos componentes de algumas vias de sinalização.

***Ânion-Radical Superóxido*** ($O_2^-$). Este radical pode ser gerado por reações de auto-oxidação e reações enzimáticas em diversas organelas celulares. Dentre as substâncias de interesse biológico que se auto-oxidam gerando o radical superóxido incluem-se a hemoglobina, a mioglobina e catecolaminas. Essas auto-oxidações são, geralmente, reações em cadeia nas quais o radical superóxido pode atuar como iniciador e propagador das cadeias radicalares. Várias enzimas, tais como a xantina oxidase, NADPH oxidase e diversas flavina desidrogenases, geram radical superóxido. Nos microssomas, o sistema NADPH-citocromo P-450 redutase/citocromo P-450 gera superóxido durante o metabolismo de diversos xenobióticos. As células fagocíticas produzem quantidades significantes de radical superóxido durante o *burst* oxidativo e a fagocitose, devido à ativação da enzima NADPH oxidase presente na membrana dessas células. O radical superóxido e outras espécies reativas geradas são importantes na destruição dos microorganismos invasores.

No processo da respiração celular o oxigênio é reduzido à água por transferência de quatro elétrons através do complexo da citocromo oxidase. No entanto, cerca de 1 a 2% do oxigênio que entra nas mitocôndrias são reduzidos a radical superóxido pela transferência direta de um elétron para o oxigênio, ao nível da ubiquinona ou do complexo da NADH desidrogenase. Assim, o aumento da tensão ou da pressão parcial de oxigênio à qual o organismo é submetido, seja por aumento da porcentagem de oxigênio no ar inspirado ou pelo aumento da pressão total de oxigênio, pode resultar em maior geração de espécies reativas de oxigênio e causar lesões em diversos órgãos como pulmões, cérebro, retina, fígado, coração, rins, medula óssea e testículos. Apesar do nome sugerir que este radical tem alto poder oxidante, o ânion-radical superóxido é um oxidante fraco, atuando na maioria das reações como um agente redutor. Esse radical também não atravessa as membranas biológicas diretamente, penetrando nas células através de canais aniônicos.

***Peróxido de Hidrogênio.*** Qualquer sistema gerador de radical superóxido produzirá peróxido de hidrogênio, pela reação de dismutação, a não ser que o radical superóxido seja interceptado por outras substâncias. A produção de peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias e microssomas geralmente ocorre por dismutação do superóxido.

$$O_2^- + O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Enzimas citoplasmáticas (xantina oxidase), mitocondriais (succinato desidrogenase e ácido graxo desidrogenase) e peroxissomais (lactato oxidase, urato oxidase, D-aminoácido oxidase) geram peróxido de hidrogênio diretamente. Algumas bactérias e micoplasmas também liberam peróxido de hidrogênio, que pode lesar células do hospedeiro, visto que o $H_2O_2$ pode atravessar membranas biológicas. O peróxido de hidrogênio é um agente oxidante fraco, porém oxida grupos tiol e alguns aminoácidos, podendo inativar diversas enzimas.

***Radical Hidroxila.*** Existem duas principais vias de produção de radical hidroxila em sistemas biológicos: radiações ionizantes e interações entre metais de transição, radical superóxido e peróxido de hidrogênio. Em decorrência do alto teor de água das células, a exposição destas às radiações ionizantes, como raios X e raios gama, resulta na formação do radical hidroxila pelo processo da radiólise da água. A ultra-sonicação de soluções aquosas e as ondas de alta energia utilizadas nos processos de litotripsia também produzem radicais hidroxila, *in vitro*. A reação do radical superóxido com o peróxido de hidrogênio forma o radical hidroxila, através da reação de Haber-Weiss:

$$O_2^- + H_2O_2 \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + O_2$$

No entanto, em sistemas biológicos (meio aquoso) essa reação ocorre com velocidade extremamente baixa, o que indica que a produção de radicais hidroxila, *in vivo*, deve ser catalisada diretamente por metais de transição, como o ferro (reação de Fenton), que deve ser mantido na forma reduzida por agentes redutores como o radical superóxido (reação de Haber-Weiss catalisada por metais de transição).

Reação de Fenton:

$$Fe^{2-} - \text{ligante} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \bullet OH + OH^-$$

Reação de Haber-Weiss catalisada por metais de transição:

$$M_n^+ + O_2^- \rightarrow M_{(n-1)} + O_2$$

$$\frac{M_{(n-1)} + H_2O_2 \rightarrow M_n^+ + \bullet OH + OH^-}{O_2^- + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \bullet OH + OH^-}$$

Os metais de transição presentes no organismo em maior abundância são o ferro e o cobre. Complexos de ferro com ADP, ATP e citrato podem catalisar a formação de radical hidroxila. O ferro ligado à transferrina e lactoferrina, em pH fisiológico, não participa da geração do radical hidroxila. No entanto, o ferro contido na ferritina (proteína de armazenamento intracelular de ferro) pode ser mobilizado por agentes redutores como o radical superóxido ou o ascorbato e catalisar a formação de radical hidroxila. O radical hidroxila é extremamente reativo, ou seja, uma vez formado tem uma meia-vida extremamente curta, reagindo rápida e inespecificamente com os alvos celulares mais próximos, podendo lesar DNA, proteínas, açúcares e lipídeos. Outras espécies oxidantes que podem ser formadas pela interação do ferro com o radical superóxido são as espécies ferril ($FeO_2^+$) e perferril ($Fe^{3+}\ O_2^-$). O radical hidroxila também pode ser formado na ozonização da água e na dissociação do peroxinitrito (espécie altamente reativa formada pela interação do radical superóxido com o óxido nítrico).

***Óxido Nítrico e Peroxinitrito.*** As células endoteliais produzem uma espécie radicalar importante, o óxido nítrico (•NO), reconhecido atualmente como sendo o fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF). Em condições normais, o óxido nítrico atua como um segundo mensageiro importante para o relaxamento dos vasos sangüíneos, atuando também na regulação da função imune e como neurotransmissor. No entanto, o óxido nítrico também pode ser potencialmente lesivo quando produzido em excesso, como ocorre durante a isquemia.

O óxido nítrico é sintetizado por uma família de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NO sintases), que catalisam a oxidação de um nitrogênio guanidínico da L-arginina para formar óxido nítrico e citrulina. As NO sintases constitutivas (isoformas I e II), presentes nas células endoteliais e nas células do tecido nervoso requerem cálcio e calmodulina como co-fatores. A NO sintetase indutível (isoforma II) não requer cálcio e calmodulina como co-fatores, produz continuamente grandes quantidades de óxido nítrico, sendo expressa em resposta a citocinas ou endotoxina em macrófagos, células endoteliais vasculares, células musculares lisas vasculares, neutrófilos e miócitos cardíacos. A superóxido dismutase aumenta a produção de óxido nítrico pela NO sintase *in vitro*, provavelmente acelerando a conversão de um intermediário da via L-arginina-NO a óxido nítrico. A lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada também aumenta a liberação de óxido nítrico em culturas de células endoteliais de aorta de coelhos. Substâncias vasorrelaxantes como a acetilcolina, serotonina, ATP e bradicinina iniciam um influxo de cálcio mediado por receptor, iniciando a produção e liberação extracelular de óxido nítrico. Após sua liberação, o óxido nítrico interage com o grupo *heme* da guanilato ciclase, levando à produção de GMPc e ao relaxamento das células musculares lisas vasculares. Além de ser um potente vasorrelaxante, o óxido nítrico inibe a agregação plaquetária e a proliferação de células do músculo liso, além de modular a proliferação de células endoteliais microvasculares.

A decomposição do óxido nítrico resulta na formação de nitrito e nitrato, que são freqüentemente utilizados como indicadores da produção de óxido nítrico pelas células. A meia-vida do óxido nítrico varia de 4 a 50 segundos, sendo praticamente o dobro na presença de superóxido dismutase. Este efeito da superóxido dismutase ocorre pela remoção do ânion radical superóxido, evitando a reação deste com o óxido nítrico para formar peroxinitrito ($ONOO^-$), ou pela oxidação do ânion nitroxila ($NO^-$) a óxido nítrico.

O radical superóxido e o óxido nítrico reagem rapidamente em soluções aquosas ($k = 6{,}7 \times 10^9\ M^{-1} \cdot s^{-1}$) para formarem o ânion peroxinitrito. Este ânion e sua forma protonada têm meia-vida muito curta ($t_{1/2} < 1$ segundo) em pH fisiológico. O ácido peroxinitroso pode sofrer um rearranjo intramolecular que resulta na formação de nitrato ($NO_3^-$), ou decompor-se homoliticamente em radical hidroxila (HO•) e dióxi-

do de nitrogênio ($\bullet NO_2$), independente da presença de metais. O ânion peroxinitrito reage diretamente com o cobre no sítio ativo da CuZn-superóxido dismutase para formar um forte agente de nitração. A velocidade de reação do peroxinitrito com a superóxido dismutase é da ordem de $10^5\ M^{-1} \cdot s^{-1}$, em baixas concentrações da enzima. A conformação *cis* do peroxinitrito é mais estável, porém esse ânion reage com a superóxido dismutase apenas na sua conformação *trans*. O ferro reage diretamente com a forma *cis* do peroxinitrito e promove maior rendimento de nitração.

A formação de peroxinitrito já foi demonstrada em diversas células, tais como células endoteliais de aorta, macrófagos e neutrófilos ativados com acetato de forbol miristato. O peroxinitrito e sua forma protonada (ácido peroxinitroso, ONOOH) são potentes oxidantes que podem oxidar lipoproteínas e lípides de membranas. O peroxinitrito e outras espécies reativas de nitrogênio podem reagir com ácidos graxos insaturados de membranas biológicas e lipoproteínas, formando os nitrolípides. Os nitrolípides compreendem uma classe de derivados lipídicos contendo ácidos graxos insaturados nitrados, mediadores da sinalização celular, que podem agir em concentrações fisiológicas. Estudos recentes observaram a presença de nitrolípides derivados dos principais ácidos graxos insaturados em plasma e lipoproteínas humanos, como por exemplo, o nitrolinoleato ($LNO_2$), produto da nitração do ácido linoléico, demonstrando a formação desses compostos *in vivo*. Estudos sugerem que estes compostos representam mais do que simples marcadores das reações antioxidante/pró-oxidante do $^{\bullet}NO$, podendo ter possíveis implicações nos processos inflamatório e aterogênico

A interação do peroxinitrito com proteínas resulta na formação de nitrotirosinas, devido à adição de um grupo nitro ($NO_2$) na posição orto da tirosina. Esta reação ocorre espontaneamente, podendo ser catalisada por metais de transição e superóxido dismutase. A nitrotirosina e seus metabólitos (ácidos 3-nitro-4-hidroxifenila-cético e 3-nitro-4-hidroxifenilpropiônico) já foram detectados na urina de humanos e a presença de nitrotirosina já foi demonstrada no endotélio, células espumosas (macrófagos) e células inflamatórias associadas às lesões ateroscleróticas de artérias coronárias humanas.

## 3. ANTIOXIDANTES E SISTEMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE

As reações radicalares ocorrem em três etapas denominadas iniciação, propagação e término, como, por exemplo, no processo de peroxidação lipídica (Figura 2).

Iniciação: $LH \rightarrow L^{\bullet}$

Propagação: $L^{\bullet} + O2 \rightarrow LOO^{\bullet}$

$LOO^{\bullet} + LH \rightarrow LOOH + L^{\bullet}$

$LOOH \xrightarrow{Fe^{2+}} LO^{\bullet} + OH^{-}$

$LOOH \xrightarrow{Fe^{3+}} LOO^{\bullet} + H^{+}$

Término: $LO^{\bullet} + LO^{\bullet} \xrightarrow{H^{+}} {}^3L = O + LO$

$LOO^{\bullet} + LOO^{\bullet} \xrightarrow{H^{+}} L = O + LOH + {}^1O_2$

**Figura 2.** Reações envolvidas no processo de peroxidação lipídica. O ácido graxo (LH) é oxidado ao radical livre L•, pela interação com uma espécie iniciadora (radical hidroxila, complexos ferro-oxigênio etc). A etapa de propagação ocorre devido à reação do radical L• com o oxigênio, formando o radical peroxil (LOO•), que pode interagir com uma nova molécula de ácido graxo gerando mais um radical L•. A decomposição do hidroperóxido lipídico (LOOH) pode ser catalisada por metais de transição, como o cobre e o ferro, ocorrendo a formação de LOO• e de radical alcoxil (LO•), que participam na propagação da cadeia radicalar. A interrupção do processo radicalar pode ocorrer pela interação entre duas espécies radicalares, formando compostos carbonílicos no estado fundamental (L = O) ou no estado excitado triplete ($^3L = O$) e os álcoois correspondentes (LOH).

Uma substância antioxidante pode ser definida como uma substância química que inibe o processo de oxidação, ou, qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares. Nesse conceito mais amplo, entende-se que o sistema de defesa antioxidante do organismo compreende uma gama variada de substâncias que atuam em diferentes níveis. O sistema de defesa primário é constituído de uma primeira linha de defesa, formada por substâncias que impedem a geração de espécies reativas, ou seqüestram-nas, de forma a impedir sua interação com alvos celulares, ou seja, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Neste item encontram-se a) enzimas antioxidantes, b) quelantes e proteínas, como a transferrina e a ceruloplasmina, que transportam ferro e cobre, respectivamente, impedindo que estes metais sejam liberados e catalisem a formação de espécies oxi-

dantes e c) substâncias não enzimáticas como o urato, ascorbato, albumina, bilirrubina e carotenóides que seqüestram radicais superóxido e hidroxila, ou suprimem oxigênio singlete. O sistema de defesa secundário é formado geralmente por compostos fenólicos ou aminas aromáticas, que atuam bloqueando a etapa de propagação da cadeia radicalar, seqüestrando radicais intermediários (como peroxil ou alcoxil). Encontram-se nesta classe os tocoferóis (vitamina E), tocotrienóis, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos. Uma terceira linha de defesa antioxidante é constituída pelos sistemas de reparo do DNA, por proteases e fosfolipases, os quais atuam removendo as lesões oxidativas do DNA, proteínas e lipídeos, respectivamente.

### 3.1. Enzimas antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio produzidas pelo metabolismo celular são mantidas em baixas concentrações intracelulares ($O_2^-$ ~ $10^{-11}$ M e $H_2O_2$ ~ $10^{-8}$ M) pela ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e catalase:

$$2\ O_2^- + H^+ \xrightarrow{SOD} O_2 + H_2O_2$$

$$2\ GSH + H_2O_2 \xrightarrow{GPx} GSSG + 2\ H_2O$$

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{catalase} 2\ H_2O + O_2$$

A função da superóxido dismutase foi descoberta em 1969 por McCord & Fridovich, o que propiciou grande avanço das pesquisas na área da toxicidade do oxigênio. Esta enzima ubiqua está presente em todos os organismos aeróbicos e catalisa a dismutação do radical superóxido. Existem três classes de superóxido dismutases: Fe-SOD, CuZn-SOD e Mn-SOD. A CuZn-SOD e a Mn-SOD encontram-se em eucariotos e a Fe-SOD, apenas em procariotos. A SOD dependente de cobre e zinco encontra-se no citoplasma celular (enzima com duas subunidades, cada uma contendo um átomo de cobre e um átomo de zinco) e nos fluidos extracelulares (EC-SOD; enzima tetramérica com 4 átomos de cobre e 4 de zinco em cada molécula), onde é secretada pelas células endoteliais. A Mn-SOD é uma enzima mitocondrial tetramérica, apresentando 1 átomo de manganês por subunidade. A SOD distribui-se em diversos órgãos na seguinte ordem de atividade específica: fígado > cérebro > testículos > rins > coração > estômago > pulmão > pâncreas. Os eritrócitos apresentam alta atividade de CuZn-SOD em comparação às plaquetas e ao plasma.

A glutationa peroxidase catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H2O2) pela glutationa reduzida (GSH) para formar glutationa oxidada (GSSG) e água (ou álcoois). A continuidade do ciclo catalítico da GPx depende da redução da glutationa oxidada pela enzima glutationa redutase, que utiliza NADPH formado pela via das pentoses. A molécula de GPx é um tetrâmero, contendo um átomo de selênio por subunidade. Nas células, cerca de 2/3 de sua atividade encontram-se no citoplasma e 1/3 nas mitocôndrias. Sua atividade varia em diversos órgãos, de acordo com a seguinte ordem: fígado > rins > pâncreas > cérebro > coração > pulmão > baço > músculos esqueléticos.

A catalase está localizada nos peroxissomos do fígado e rins e em microperoxissomos de outras células. É uma hemeproteína contendo quatro grupos *heme*. Tem especificidade para o peróxido de hidrogênio, não atuando sobre peróxidos orgânicos. Pelo fato de estar compartimentalizada nos peroxissomos, exceto nos eritrócitos, e ter baixa afinidade pelo peróxido de hidrogênio, em comparação à GPx, a catalase é mais importante em condições nas quais ocorre a formação de altas concentrações de peróxido de hidrogênio. A catalase ocorre em alta atividade no fígado e nos eritrócitos e em baixa atividade no cérebro.

A família das peroxiredoxinas catalisa a redução de $H_2O_2$ e de hidroperóxidos a água e álcool, respectivamente, utilizando equivalentes redutores provenientes de proteínas que contém grupos tiol. Todas as peroxiredoxinas são homodímeros e contém uma cisteína em seu sítio ativo. Atualmente, estão descritos em três subgrupos de peroxiredoxinas, que se caracterizam por sua localização, no citosol ou mitocôndria, e pelo número de cisteínas. Sua abundância nas células, constituindo 0,1 a 0,8% das proteínas solúveis totais, parece estar relacionada à proteção dos componentes celulares através da remoção de baixos níveis de peróxidos resultantes do metabolismo celular fisiológico. Estudos demonstraram que a expressão elevada de peroxiredoxinas diminui a concentração intracelular de $H_2O_2$ induzida por PGDF ou TNFα, inibe a ativação de NFkB e a apoptose.

### 3.2. Ascorbato

As plantas e várias espécies animais podem sintetizar o ácido ascórbico a partir da glicose, mas o homem, durante sua evolução, perdeu uma das enzimas necessárias para a sua síntese, devendo obtê-lo a partir da dieta. O ácido ascórbico é necessário *in*

*vivo* como co-fator de enzimas, como as hidroxilases de prolina e lisina, envolvidas na biossíntese do colágeno e a dopamina-β-hidroxilase, que converte a dopamina à adrenalina. Devido ao seu baixo potencial de redução, o ascorbato reage como um antioxidante com a maior parte dos radicais livres formados nos sistemas biológicos. A oxidação unieletrônica do ascorbato resulta na formação do radical ascorbil, que pode ser considerado como um indicador do estresse oxidativo. Esta ação antioxidante do ascorbato é importante, por exemplo, para regenerar o radical tocoferil a alfa-tocoferol, preservando a capacidade antioxidante desse último nas membranas biológicas. O radical ascorbil é relativamente estável e atóxico, podendo sofrer uma reação de dismutação com a formação de ascorbato e desidroascorbato. Esse último pode ser novamente reduzido à ascorbato pela enzima desidroascorbato redutase em diversas espécies. No entanto, metais de transição, como cobre e ferro, podem catalisar a oxidação do ácido ascórbico em soluções aquosas, gerando os radicais superóxido e hidroxila. Portanto, a associação de ácido ascórbico com metais de transição deve ser evitada. O ascorbato reage com os radicais superóxido e hidroxila, gerando radical ascorbil; interage também com oxigênio singlete, reduz o radical tiil (-S• ) e combina-se com o ácido hipocloroso, potente oxidante gerado pela mieloperoxidase de leucócitos presentes nos focos inflamatórios. O ascorbato é um antioxidante hidrossolúvel importante para os fluidos extracelulares (como o plasma sangüíneo e o fluido intersticial do pulmão) e de estruturas com baixa atividade da superóxido dismutase, como o cristalino.

### 3.3. Glutationa

A glutationa (GSH) é um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico. A glutationa é um seqüestrador de radical hidroxila e de oxigênio singlete. Deficiências da síntese de GSH nas células animais têm conseqüências sérias como, por exemplo, a lise de eritrócitos. A glutationa atua como co-fator de várias enzimas em diferentes vias metabólicas (glutationa peroxidase, glioxilase, maleilacetoacetato isomerase e prostaglandina endoperóxido isomerase) e participa de diversos processos de desintoxicação (conjugação com xenobióticos pela ação da glutationa-S-transferase e remoção de peróxido via glutationa peroxidase). No fígado, a presença de compostos que são transformados em ácidos mercaptúricos, como o paracetamol, diminui a concentração de GSH e, conseqüentemente, a capacidade do fígado em eliminar peróxidos pela ação da glutationa peroxidase, também diminui. Contudo, a geração de grandes quantidades de peróxido de hidrogênio pelas células pode promover um acúmulo de glutationa oxidada (GSSG). A auto-oxidação da GSH pode ser catalisada também por íons de ferro ou cobre, levando à formação do radical tiil (GS e GSSG), como intermediário e à posterior geração de glutationa oxidada, radical superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, como produtos. Essas espécies reativas podem estar envolvidas em alguns efeitos tóxicos da glutationa observados *in vitro*.

### 3.4. Tioredoxinas

As tioredoxinas são proteínas encontradas em procariontes e eucariontes, com ampla distribuição celular. As tioredoxinas são caracterizadas por sua capacidade de reduzir ligações dissulfeto (ligação S-S) em ditióis (2 grupos -SH). Neste processo, as tioredoxinas são oxidadas da forma ditiol para a forma dissulfeto, voltando a ser ativadas pela enzima tioredoxina redutase, que utiliza NADPH como doador de elétrons. Dessa forma, o sistema da tioredoxina e da GSH como antioxidantes redutores de dissulfetos são similares, embora esses dois sistemas operem independentemente e tenham papéis específicos na sinalização. Mamíferos possuem um sistema de enzimas acopladas à tioredoxina na mitocôndria. Foi demonstrado que a regulação da produção de espécies reativas de oxigênio por uma tioredoxina mitocondrial reduz o estresse oxidativo e aumenta a disponibilidade de óxido nítrico, preservando a função endotelial vascular.

### 3.5. Melatonina

Em vertebrados, a melatonina é uma indolamina formada na glândula pineal, olhos e possivelmente em outros tecidos, que modula algumas funções dos sistemas endócrino e circadiano. Estas ações da melatonina são mediadas por receptores localizados nas membranas das células do cérebro (núcleo supraquiasmático e hipófise) e de tecidos não-neurais. Recentemente, descreveu-se uma ação antioxidante da melatonina, independente de sua interação com receptores, decorrente de sua capacidade de seqüestrar radicais hidroxila *in vitro*. Além disso, a melatonina modula a expressão de genes de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, glutationa peroxidase e catalase, em condições fisiológicas e sob estresse oxidativo. Pelo fato da melatonina ser lipofílica e altamente difusível, está distribuída no organismo, tanto nos fluidos extracelulares, como no interior das células, podendo ser um componente importante do sistema de defesa antioxidante.

## 3.6. Metalotioneínas

As metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular encontradas no citoplasma e no núcleo celular, principalmente no fígado, rins e intestino. Estas proteínas são ricas em cisteína e têm a capacidade de ligar íons metálicos como zinco ($Zn^{2+}$), cobre ($Cu^{2+}$), cádmio ($Cd^{2+}$) e mercúrio ($Hg^{2+}$), pela associação destes íons com os grupos tiol (-SH) da cisteína. A síntese das metalotioneínas pode ser estimulada por metais como o cádmio, zinco e cobre e por compostos não metálicos como o etanol, indometacina, agentes alquilantes, quelantes, interleucinas (IL1 e IL6) e interferon alfa. As funções propostas para as metalotioneínas incluem o armazenamento de metais pesados sob forma não tóxica, a regulação do metabolismo celular de cobre e zinco, assim como da absorção intestinal destes metais. As ações antioxidantes das metalotioneínas devem-se à quelação de íons cobre, liberação de zinco, que poderia inibir a peroxidação lipídica, e ao alto conteúdo de grupos tiol que podem interagir com oxigênio singlete, radical superóxido e radical hidroxila. A indução das metalotioneínas em animais diminui a toxicidade de alguns compostos como a adriamicina, aumenta a resistência aos efeitos da radiação ionizante e está relacionada à proteção antioxidante no músculo cardíaco em casos de isquemia/reperfusão.

## 3.7. Antioxidantes lipossolúveis

***Tocoferóis (vitamina E).*** A palavra tocoferol origina-se do grego *tokos*, que significa parto, tendo sido utilizada no início do século, durante estudos relacionando nutrição e fertilidade, nos quais se demonstrou que a vitamina E restaurava a fertilidade de animais com deficiência desta vitamina, devido à dieta contendo lípides peroxidados. Os tocoferóis com atividade de vitamina E, compreendem duas séries de compostos com estruturas químicas diferentes, trienóis e tocóis, que se distinguem pelo grau de saturação da cadeia lateral.

Pelo fato de serem lipossolúveis, os tocoferóis se acumulam no interior das biomembranas, protegendo-as contra o processo de lipoperoxidação. O α-tocoferol predomina nas membranas celulares, sendo um antioxidante mais eficaz que os outros tocoferóis devido à posição orto dos seus grupos metílicos, o que o torna um melhor doador de hidrogênio. Entretanto, recentemente, grande interesse tem sido voltado ao γ-tocoferol, uma vez que estudos *in vitro* e experimentais indicam atividades antioxidante e antiinflamatória deste composto. No plasma sangüíneo, os tocoferóis são transportados pelas lipoproteínas, principalmente pela lipoproteína de baixa densidade. As membranas mitocondriais contêm, em média, uma molécula de α-tocoferol por 2.100 moléculas de fosfolipídeos. O α-tocoferol suprime e reage com o oxigênio singlete, seqüestra os radicais superóxido e hidroxila podendo, portanto, bloquear o início da peroxidação lipídica. Entretanto, sua principal ação antioxidante nas membranas biológicas consiste em interromper a fase de propagação da lipoperoxidação, doando um átomo de hidrogênio para os radicais peroxil e alcoxil derivados da oxidação dos ácidos graxos e interrompendo a cadeia radicalar da peroxidação lipídica. O radical tocoferil é pouco reativo e não oxida os ácidos graxos das membranas. No entanto, em determinadas condições, o radical tocoferil pode interagir com o ácido graxo, regenerando o α-tocoferol e formando um radical peroxil, com a conseqüente propagação da cadeia radicalar da peroxidação lipídica. Se o processo de lipoperoxidação for muito intenso, o α-tocoferol da membrana será completamente convertido ao radical tocoferil, perdendo sua ação antioxidante. Portanto, o radical tocoferil deve ser regenerado por substâncias como o ácido ascórbico, glutationa reduzida ou ubiquinol que o reduzem novamente a α-tocoferol. A ação antioxidante do tocoferol ocorre também por modificação da estrutura da membrana, afetando o tipo de ácido graxo que se incorpora às membranas.

A alimentação de animais com ácidos graxos insaturados aumenta as necessidades de vitamina E. Tecidos de animais deficientes em vitamina E apresentam maior índice de peroxidação lipídica e os animais tornam-se mais sensíveis à ação tóxica do oxigênio. A deficiência de α-tocoferol por períodos curtos na dieta de humanos adultos não promove sinais agudos de doença, provavelmente pela ação de outros mecanismos de proteção antioxidante ou pela regeneração do α-tocoferol das membranas pelo ácido ascórbico. A depleção dos depósitos de vitamina E do organismo pode ocorrer, em adultos, em casos de anormalidades na absorção intestinal de gorduras e distúrbios do metabolismo lipídico (abetalipoproteinemia). Os níveis plasmáticos de vitamina E em neonatos prematuros são freqüentemente baixos e foram observados resultados positivos da suplementação da vitamina E na síndrome hemolítica da prematuridade, assim como na prevenção da fibroplasia retrolenticular. A vitamina E é um constituinte importante da membrana do músculo cardíaco e tem mostrado efeitos benéficos na lesão oxidativa cardíaca induzida experimentalmente. Estudos epidemiológicos recentes demonstraram uma relação entre a alta ingestão de vitamina E e o risco mais baixo para o desenvolvimento de doenças cardíacas coronarianas. Isto pode ser devido

ao fato da vitamina E e de outros antioxidantes lipossolúveis inibirem a oxidação da lipoproteína de baixa densidade, o que atenuaria a aterogenicidade desta lipoproteína. Não têm sido observados efeitos tóxicos decorrentes da ingestão de altas doses de vitamina E por via oral, provavelmente pelo fato da maior parte ser eliminada pelas fezes. Entretanto, foi demonstrado, *in vitro*, que concentrações muito altas ou muito baixas de vitamina E diminuem a capacidade dos leucócitos de destruir bactérias devido à inibição da produção de radical superóxido durante o *burst* oxidativo das células fagocíticas.

Os tocotrienóis, que diferem dos tocoferóis por apresentarem uma cadeia lateral poliinsaturada, estão presentes normalmente em diversos cereais, como a cevada, aveia etc., e óleos vegetais. Estes compostos atuam como antioxidantes e podem inibir a síntese do colesterol.

***Ubiquinonas.*** As ubiquinonas são compostos lipofílicos, cuja principal função é atuar como componentes redox dos sistemas de transporte de elétrons transmembrana, como na cadeia respiratória mitocondrial. Entretanto, as ubiquinonas nas suas formas reduzidas, ubiquinóis, podem atuar como antioxidantes *in vivo* e *in vitro*. Nas membranas biológicas, os ubiquinóis com cadeias isoprenóides curtas, $Q_1$–$Q_4$, são inibidores muito mais potentes da peroxidação lipídica do que os homólogos com cadeias mais longas, $Q_5$–$Q_{10}$. As diferenças no poder antioxidante dos ubiquinóis nas membranas dependem principalmente das diferenças de partição entre as membranas, da mobilidade intramembrana e da distribuição não uniforme nelas. O ubiquinol 10, que é a forma reduzida da coenzima $Q_{10}$, encontra-se distribuído tanto na membrana plasmática como nas membranas intracelulares, sendo também um antioxidante importante para a proteção das lipoproteínas, inclusive da LDL, além de promover efeitos benéficos em doenças neurodegenerativas.

***Carotenóides.*** Os carotenóides são pigmentos dos tecidos fotossintéticos de vegetais e são adquiridos pelo organismo humano pela dieta, principalmente pela ingestão de frutas e legumes. Cerca de 600 carotenóides já foram identificados, sendo que cerca de 10% destes compostos apresentam atividade pró-vitamina A. Neste sentido, o β-caroteno é o mais potente ao passo que outros carotenóides, como o licopeno e a luteína, não apresentam essa atividade. A conversão do β-caroteno à vitamina A (retinol) é catalisada pela enzima 15'15'-dioxigenase nas células intestinais e hepáticas. Esta conversão é controlada por um mecanismo homeostático que limita a conversão a retinol. Assim, em pessoas que ingerem alimentos ricos em vitamina A, por exemplo, leite e derivados, a taxa de conversão de β-caroteno à vitamina A é baixa. Os carotenóides mais hidrofóbicos, como o α e β-caroteno e licopeno, são transportados no plasma pelas lipoproteínas (LDL, VLDL e HDL), enquanto os carotenóides mais polares como a luteína e a zeaxantina são transportados por outras proteínas. A distribuição dos carotenóides e tocoferóis também difere entre as diversas subfrações das lipoproteínas. Os carotenóides transportados pelas lipoproteínas concentram-se principalmente nos tecidos com maior número de receptores da LDL como o fígado, glândulas adrenais e testículos. Os carotenóides polares concentram-se mais na retina, principalmente na mácula, onde têm como função suprimir espécies excitadas de oxigênio geradas pela luz, protegendo as células fotorreceptoras da retina.

Os carotenóides atuam como supressores de oxigênio singlete e como seqüestradores de radicais livres. Sua atividade antioxidante é relevante especialmente nas baixas tensões de oxigênio observadas em condições fisiológicas. O β-caroteno reage diretamente com radicais peroxil formados durante a peroxidação lipídica, protegendo as membranas celulares e as lipoproteínas contra modificações oxidativas. Em contraste com a vitamina E, o β-caroteno não altera a produção de radical superóxido pelas células fagocíticas. O efeito anticarcinogênico dos carotenóides foi constatado em diversos sistemas *in vitro* e em modelos experimentais com animais. Carotenóides inibem a proliferação e transformação celular, além de interferir na expressão de vários genes. Portanto, a conexão entre as funções antioxidantes dos carotenóides e seus efeitos em diversos modelos experimentais de carcinogênese ainda deve ser elucidada, podendo outros mecanismos de ação estar envolvidos.

## 3.8. Antioxidantes dos fluidos extracelulares

Os fluidos extracelulares, tais como o plasma sangüíneo, fluido cefalorraquidiano, fluido sinovial e plasma seminal contêm baixas atividades de catalase, superóxido dismutase e glutationa peroxidase, assim como baixa concentração de glutationa reduzida (GSH). Os antioxidantes lipossolúveis mais hidrofóbicos presentes nas lipoproteínas plasmáticas não atuam sobre radicais livres presentes na fase aquosa do compartimento plasmático gerados por enzimas, pela autoxidação de diversos compostos e pelas células fagocíticas ativadas. No sangue, o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio podem difundir-se para o interior dos eritrócitos

(o radical superóxido atravessa a membrana eritocitária através de um canal iônico) para serem degradados, respectivamente, pela superóxido dismutase, catalase ou glutationa peroxidase. No entanto, a formação do radical hidroxila, a partir destas duas espécies, deve ser evitada principalmente por substâncias que possam quelar metais de transição, evitando a ocorrência da reação de Fenton. Sob este aspecto, as proteínas plasmáticas que têm sítios ligantes para metais, principalmente para o ferro e o cobre, podem ser consideradas como antioxidantes. As mais importantes são a transferrina e a ceruloplasmina. A transferrina plasmática tem apenas 20 a 30% dos seus sítios ligantes ocupados pelo ferro3+, significando que, em condições normais, não ocorre a presença de ferro3+ livre no plasma. O ferro ligado à transferrina ou à lactoferrina, secretada pelas células fagocíticas, não catalisa a formação do radical hidroxila e não promove peroxidação lipídica. Entretanto, a hemoglobina, em algumas condições, pode estimular a peroxidação lipídica, seja por sua decomposição e liberação de ferro ou por interação direta de peróxidos com a proteína. O grupo *heme* também pode catalisar a peroxidação lipídica. A ligação da hemoglobina livre à haptoglobina e do *heme* à hemopexina diminui a possibilidade do ferro presente nestes composto de estimular a lipoperoxidação.

A ceruloplasmina, além de atuar como ligante de íons cobre, também é importante em relação a alguns aspectos do metabolismo do ferro. Essa proteína oxida o ferro$^{2+}$ a ferro$^{3+}$ sem liberar radicais de oxigênio para o meio externo. A atividade ferroxidásica da ceruloplasmina impede que o ferro$^{2+}$ catalise a formação do radical hidroxila, a partir de peróxido de hidrogênio. Além disso, a ceruloplasmina reage estequiometricamente com o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio.

A albumina também tem sítios de ligação para os íons cobre, inibindo a peroxidação lipídica dependente de cobre e/ou ferro e a formação do radical hidroxila, *in vitro*. A molécula de albumina pode ser alterada pelas reações radicalares que ocorrem em sua superfície, principalmente pela interação com grupos sulfidrila, mas a alta concentração plasmática de albumina e seu *turnover* relativamente rápido tornam esses efeitos insignificantes biologicamente. A albumina também atua como seqüestrador do ácido hipocloroso, liberado pela mieloperoxidase dos fagócitos, impedindo que este agente altamente oxidante destrua alvos mais importantes como a alfa-1-antiprotease (alfa-1-antitripsina). A albumina é importante para o transporte dos ácidos graxos livres na circulação sangüínea e acredita-se que a bilirrubina ligada à albumina seja importante para evitar a oxidação desses ácidos graxos, durante a exposição da proteína aos agentes iniciadores da peroxidação lipídica. Além disso, a albumina pode se ligar a flavonóides provenientes da dieta, contribuindo para a função antioxidante.

O ácido úrico é o produto final do metabolismo das purinas. Atua como antioxidante e tem alta capacidade de seqüestrar radical hidroxila, radicais peroxil (ROO•), oxigênio singlete, ozônio e ácido hipocloroso, tendo ainda a capacidade de quelar cobre e ferro. Assim como o ascorbato e a GSH, o ácido úrico forma radicais livres menos reativos ao reagir com o radical hidroxila.

Outros fluidos biológicos extracelulares possuem uma defesa antioxidante preventiva ainda menor que a do plasma sangüíneo. O líquido cefalorraquidiano, por exemplo, contém pequenas quantidades de albumina, transferrina e ceruloplasmina, embora apresente níveis mais elevados de ácido ascórbico.

## 3.9. Sistema de reparo

Apesar da presença dos vários componentes dos sistemas de defesa antioxidante acima descritos, as lesões induzidas por radicais livres podem ocorrer *in vivo*. Estas lesões oxidativas devem ser removidas das macromoléculas pelos sistemas de reparo para evitar alterações das funções celulares. A seguir serão descritos alguns desses sistemas.

***Reparo do Ácido Desoxirribonucléico (ADN).*** No núcleo celular, o ADN não replicante interage com proteínas básicas denominadas histonas, que auxiliam na proteção do ADN contra a lesão por radicais livres. Apesar disso, alguns cálculos teóricos estimam que possam ocorrer cerca de 1.000 eventos lesivos, mediados por agentes oxidantes, sobre o ADN de cada célula do organismo humano por dia. Os mecanismos envolvidos na remoção das lesões produzidas pela interação do radical hidroxila com o ADN atuam através do reparo por excisão. A enzima ADN glicosilase remove bases lesadas por clivagem das ligações base-desoxirribose, deixando sítios apurínicos ou apirimidínicos (AP). Posteriormente uma ADN AP endonuclease cliva a fita de ADN no sítio AP e o fragmento é formado, através da síntese de novo ADN, ligando-se à fita de ADN pela ação da ADN ligase. As quebras de fita do ADN resultam na ativação da poli (ADP-ribose) sintetase, que também atua no mecanismo de reparo. A importância destes sistemas de reparo pode ser observada em doenças em que ocorrem deficiências dos mesmos, tais como a síndrome de Bloom, deficiência de ADN ligase I, caracterizada por aberrações cromossômicas, alterações de crescimento,

imunodeficiência e maior risco de câncer, assim como no xeroderma pigmentosum (deficiência na clivagem de bases timina modificadas) em que ocorre uma hipersensibilidade à luz solar e um grande aumento da incidência de câncer de pele.

***Reparo e Degradação de Proteínas Oxidadas.*** Vários sistemas oxidantes enzimáticos e não enzimáticos catalisam a inativação oxidativa de enzimas. Estas oxidações promovem modificações envolvendo resíduos de histidina, prolina, arginina e lisina dentre outros aminoácidos, originando compostos carbonílicos e outros produtos. Biologicamente, essas oxidações representam passos marcantes no *turnover* das proteínas, estando implicadas também no acúmulo de proteínas alteradas durante o envelhecimento e em diferentes condições patológicas. Estudos mecanísticos demonstram que reações de Fenton sítio-específicas, ou seja, em pontos de ligação de metais às proteínas, geram espécies reativas de oxigênio (radical hidroxila, íon ferril, oxigênio singlete) que atacam as cadeias laterais dos aminoácidos no sítio de ligação do metal. Em contraste às reações sítio-específicas catalisadas por íons metálicos, a exposição de proteínas à radiação ionizante leva à modificação, virtualmente, de todos os resíduos de aminoácidos, embora a cisteína, histidina, tirosina, metionina e o triptofano sejam os alvos preferenciais.

A ação do oxigênio singlete, ácido hipocloroso ou radical hidroxila sobre o aminoácido metionina promove sua oxidação à metionina sulfóxido. As proteínas presentes no cristalino de pacientes portadores de catarata contêm quantidades significantes de metionina sulfóxido, sugerindo o envolvimento de oxigênio singlete, produzido pelas reações de fotossensibilização, na lesão destas proteínas. No cristalino, nos pulmões, fígado, rins, cerebelo, neurônios cerebrais e nos neutrófilos existe a enzima metionina sulfóxido redutase que catalisa a redução de metionina sulfóxido, dependente de tioredoxina, regenerando a metionina e reativando a proteína. Camundongos *knockout* para o gene de metionina sufóxido redutase apresentam sensibilidade elevada ao estresse oxidativo, diminuição no tempo de vida e disfunções neurológicas.

As proteínas irreversivelmente lesadas por oxidação são degradadas a uma velocidade maior que as proteínas não modificadas, pela ação de enzimas proteolíticas presentes no citoplasma e nas mitocôndrias. Esses sistemas proteolíticos, os proteosomos, reconhecem especificamente as proteínas modificadas oxidativamente, devido às suas alterações conformacionais, degradando-as e fornecendo aminoácidos para a síntese de novas proteínas, impedindo o acúmulo de proteínas não funcionais nas células.

## 4. ESTRESSE OXIDATIVO

### 4.1. Conceito

O estresse oxidativo ocorre em situações em que há desequilíbrio entre os níveis de antioxidantes e de pró-oxidantes, com o predomínio destes últimos. Assim, a diminuição dos sistemas de defesa antioxidante ou o aumento da geração de espécies oxidantes, radicalares ou não, pode resultar em lesões oxidativas em macromoléculas e diversas estruturas celulares que, se não forem reparadas, alterarão a funcionalidade de células, tecidos e órgãos.

### 4.2. Condições clínicas associadas ao estresse oxidativo

Um grande número de condições clínicas tem sido relacionado ao estresse oxidativo. É importante saber se o aumento da geração de espécies oxidantes é a causa ou a conseqüência de uma determinada doença. Existem evidências de que, em alguns casos, as espécies reativas são a causa primária da lesão. Por exemplo, na cardiomiopatia induzida pela deficiência de selênio, ou síndrome de Keshan, a diminuição da glutationa peroxidase resulta em menor remoção de peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, os quais podem lesar as fibras cardíacas. Em relação aos tumores, foi demonstrado que as lesões em ADN por radicais livres são importantes na fase de iniciação da carcinogênese, embora atualmente se considere que as espécies reativas de oxigênio possam ser importantes também na fase de promoção tumoral, devido à ação das mesmas no controle da proliferação celular. No entanto, na maioria das doenças, o aumento da formação de espécies oxidantes, radicalares ou não, é uma conseqüência da atividade da doença, sendo que estas espécies podem estar envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças, ou podem representar apenas um epifenômero. Por exemplo, a infiltração e ativação de um grande número de neutrófilos em um sítio inflamatório gera grandes quantidades de radical superóxido e peróxido de hidrogênio, promovendo um estresse oxidativo localizado e contribuindo para a lesão tecidual, independente do que tenha causado essa resposta inflamatória. Entretanto, muitas formas de lesão tecidual podem promover um aumento de reações radicalares como a peroxidação lipídica, em decorrência da inativação de antioxidantes teciduais e da descompartimentalização de metais dentro das células. As lesões traumáticas do cérebro e da coluna vertebral aumentam a disponibilidade de ferro para a catálise da formação de radicais livres iniciadores da peroxidação lipídica, que contribui para a degeneração dos tecidos. Por outro lado, o aumento da pero-

xidação lipídica nos músculos de pacientes com distrofia muscular pode ser apenas uma conseqüência da lesão tecidual promovida por outros mecanismos.

***Aterosclerose.*** As lesões mais precoces observadas na aterosclerose são as estrias gordurosas, formadas principalmente por macrófagos com alto conteúdo de ésteres de colesterol no citoplasma (células espumosas). O aumento do colesterol da lipoproteína de baixa densidade, LDL, é um fator de risco importante para o desenvolvimento da aterosclerose, visto que esta lipoproteína contribui para a distribuição do colesterol aos diversos tecidos do organismo. A LDL penetra nas células através da endocitose mediada por receptores B/E presentes na superfície celular, que reconhecem lipoproteínas contendo as apolipoproteínas B e/ou E. Após a endocitose da LDL, a partícula é degradada por enzimas lisossômicas e o colesterol é liberado para o citoplasma da célula. O aumento do colesterol intracelular promove três eventos principais nas células: a inibição da HMG-CoA redutase, enzima que limita a velocidade da biossíntese do colesterol, a ativação da ACAT, enzima que esterifica o colesterol intracelular e a diminuição da expressão de receptores B/E, o que impede a entrada de mais partículas de LDL para o interior das células. Este controle por retroalimentação negativa impede o acúmulo intracelular de colesterol e, portanto, este mecanismo não pode explicar a formação das células espumosas. Além disso, indivíduos portadores de hipercolesterolemia familiar, que são deficientes em receptores B/E, desenvolvem aterosclerose precocemente. Estudos *in vitro* demonstram que a LDL nativa não induz a transformação de macrófagos em células espumosas, indicando que a apolipoproteína B pode sofrer alterações pós-translacionais e ser endocitada por outros receptores. Brown & Goldstein demonstraram que a LDL modificada por acetilação, acetil-LDL, é captada pelos macrófagos por vias alternativas através de um receptor diferente do receptor B/E, que foi denominado de receptor *scavenger*. A captação da LDL modificada por receptores *scavenger* de macrófagos em cultura induz a transformação dos mesmos em células espumosas. Biologicamente, um tipo importante de modificação da LDL seria sua oxidação mediada por metais de transição, principalmente cobre e ferro e espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio geradas por células endoteliais, macrófagos, células de músculo liso, monócitos e neutrófilos ativados. A peroxidação dos lipídeos da LDL gera como produtos vários aldeídos (malonaldeído, nonenal etc.) que reagem principalmente com grupos ε-amino dos resíduos lisina da apolipoproteína B, tornando a partícula de LDL mais negativa, o que permite sua ligação ao receptor *scavenger*. A modificação oxidativa da LDL resulta em alterações das suas características físico-químicas, que conferem a esta partícula modificada várias propriedades. Assim, a LDL oxidada é citotóxica para células endoteliais, quimiotática para monócitos circulantes e induz a diferenciação e a adesão de monócitos às células endoteliais. Foi demonstrado que radicais livres catalisam a oxidação da LDL, uma vez que foi observado associação espacial entre LDL oxidada, espécies reativas de oxigênio e subunidades da NAD(P)H oxidase. A presença de LDL oxidada *in vivo* foi evidenciada através da sua detecção nas lesões ateroscleróticas e pela presença de anticorpos que reconhecem epitopos da LDL oxidada, no plasma de indivíduos com aterosclerose. A oxidação da LDL ocorre predominantemente no espaço subendotelial, embora não se exclua a possibilidade desse processo ocorrer também no compartimento plasmático.

***Lesões por Isquemia e Reperfusão.*** A lesão por reperfusão pode ser definida como a lesão que ocorre a um órgão durante o restabelecimento do fluxo sangüíneo após um episódio de isquemia. Quando a tensão de oxigênio dos tecidos diminui além de um determinado período crítico, a lesão isquêmica torna-se irreversível. Este período de tempo depende do grau da hipóxia ou isquemia e do tecido no qual está ocorrendo este processo. Por exemplo, o músculo esquelético é bastante resistente à hipóxia (pode suportar algumas horas sem sofrer lesão), enquanto que as células cerebrais são extremamente sensíveis, não sobrevivendo à isquemia por mais de alguns minutos, sendo que o coração pode suportar até 20 minutos, dependendo da extensão da hipóxia. Pelo fato da isquemia poder induzir lesão e eventualmente a morte celular, o restabelecimento do fluxo sangüíneo deveria ocorrer rapidamente. No entanto, estudos em órgãos isolados demonstram que se a isquemia *per se* não causar lesão irreversível, as funções dos tecidos são melhor preservadas quando antioxidantes são incorporados ao meio de reperfusão. Sabe-se que a reoxigenação aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio que contribuem para acentuar as lesões nos tecidos previamente isquêmicos. Isto pode ocorrer em algumas condições clínicas como na angina instável e em certos procedimentos terapêuticos, tais como a angioplastia coronariana, a trombólise e *bypass* cardiopulmonar durante a cirurgia cardíaca, nas quais o coração é exposto a uma isquemia transiente. Paradoxalmente, enquanto a reperfusão do miocárdio é necessária para restaurar sua atividade metabólica normal, a reoxigenação do miocárdio pode resultar em efeitos lesivos ao órgão.

Existem várias evidências, diretas e indiretas, para a contribuição de espécies radicalares à lesão por reperfusão no miocárdio. Estudos de ressonância paramagnética eletrônica com captação de *spin* têm confirmado a formação de radicais livres, *in vivo*, em modelos animais de oclusão transiente e em estudos com coração isolado. As evidências indiretas consistem no efeito de substâncias que seqüestram ou inibem a geração de radicais livres, assim como de antioxidantes secundários, em reduzir o tamanho do infarto e atenuar a incidência de arritmias pós-isquêmicas e disfunções contráteis. Além disso, há um número crescente de evidências, baseadas em investigações genéticas, onde a maior expressão ou a inibição de genes relacionados à defesa antioxidante tem grande influência sobre os eventos bioquímicos caracterizados na isquemia-reperfusão. Deve-se considerar, portanto, que a reperfusão do órgão deve ser feita o mais breve possível, mas que a extensão da necrose também poderia ser reduzida evitando-se a lesão durante o período de reperfusão. As alterações associadas à reperfusão envolvem vários eventos incluindo o acúmulo de cálcio pelas células cardíacas, possivelmente por alterações das membranas ou trocas sódio-cálcio, redução da reperfusão e prolongamento da isquemia devido ao *swelling* das células endoteliais, edema intersticial ou acúmulo e ativação de neutrófilos com a liberação de substâncias citotóxicas como citocinas e radicais livres, assim como de enzimas proteolíticas. A diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante endógena durante a isquemia torna o miocárdio isquêmico mais suscetível à lesão por radicais livres durante a reperfusão.

Várias células, organelas e enzimas podem estar envolvidas na formação de radicais livres derivados do oxigênio na isquemia e reperfusão. A lesão tecidual ao início da reperfusão mediada por radicais livres pode estar relacionada: 1) à adesão e ativação de neutrófilos no sítio de lesão endotelial, após o evento isquêmico; 2) ao aumento da formação de radical superóxido a partir do "extravasamento" de elétrons da cadeia respiratória nas mitocôndrias das células endoteliais, devido ao acúmulo de equivalentes redutores, durante o período isquêmico; 3) à conversão da enzima xantina desidrogenase à xantina oxidase, pela ação de proteases cálciodependentes, ativadas pelo aumento de cálcio durante o período isquêmico, ou por oxidação de grupos tióis e concomitante catabolismo de ATP em hipoxantina e xantina, possibilitando que, na reoxigenação, a xantina oxidase catalise a formação de radical superóxido e ácido úrico, relevante principalmente na isquemia intestinal, visto que a atividade da xantina desidrogenase é extremamente baixa no coração; 4) à formação de espécies oxidantes (ferril e perferril) a partir de *heme* proteínas (mioglobina, ciclooxigenase e lipooxigenase) e 5) à descompartimentalização de ferro, derivado da mioglobina, hemoglobina e ferritina, possibilitando a geração de radicais hidroxila. Tem-se sugerido que a geração de espécies oxidantes por estes sistemas seria tão intensa que promoveria a inativação da superóxido dismutase, catalase e de algumas antiproteases, assim como do óxido nítrico (•NO), fator de relaxamento do endotélio.

***Doenças Auto-Imunes e Inflamação Crônica.*** O organismo tem mecanismos para impedir a formação de anticorpos que reconheçam seus próprios componentes. As falhas destes mecanismos permitem a formação de auto-anticorpos que ligam-se aos componentes do próprio organismo, promovendo lesões. As causas de auto-imunidade ainda não estão esclarecidas, embora fatores hereditários, assim como alguns vírus e fármacos, possam estar envolvidos. Em 1982, Halli-well propôs que alguns oxidantes poderiam interagir com biomoléculas normais e originar novos determinantes antigênicos e que isto poderia contribuir para a auto-imunidade em algumas situações. Demonstrou-se que a exposição do ADN ao radical superóxido, *in vitro*, torna-o antigênico quando injetado em animais. Espécies oxidantes como o radical hidroxila e ácido hipocloroso, provenientes de células fagocíticas ativadas, podem alterar o comportamento antigênico da imunoglobulina G, produzindo agregados fluorescentes que ativam células fagocíticas e são pró-inflamatórios. Estas imunoglobulinas modificadas poderiam induzir a formação de auto-anticorpos (fator reumatóide).

Emerit e colaboradores demonstraram que o soro de pacientes com lupus eritematoso apresenta um fator clastogênico que induz lesões cromossômicas, quando adicionado a culturas de linfócitos isolados de indivíduos normais. Além disso, os linfócitos dos pacientes lúpicos são lesados quando expostos à luz (comprimentos de onda = 360-400 nm) na presença deste fator clastogênico. A superóxido dismutase inibe ambos os processos quando adicionada ao meio de cultura, indicando a participação do radical superóxido nestes processos. Apesar destas evidências experimentais, ainda existem poucos relatos de casos demonstrando efeitos benéficos de seqüestradores de radicais de oxigênio no tratamento de doenças auto-imunes em humanos.

A artrite reumatóide é uma doença caracterizada pela inflamação crônica das articulações, tendo várias características de uma doença auto-imune, embora sua causa seja desconhecida. Têm-se descrito

alguns efeitos benéficos da superóxido dismutase na osteoartrite e nas inflamações periarticulares, porém, ainda não há dados conclusivos em relação à artrite reumatóide. O fluido sinovial de pacientes com artrite reumatóide apresenta alto teor de produtos derivados da peroxidação lipídica. Tanto o plasma sangüíneo como o fluido sinovial destes pacientes contêm concentrações subnormais de ascorbato, sendo que a maior parte dele está na forma oxidada (desidroascorbato, provavelmente formado por oxidação do ascorbato pelo radical superóxido). Como o fluido sinovial apresenta normalmente baixas atividades de enzimas antioxidantes, o superóxido e o peróxido de hidrogênio gerados por fagócitos nas articulações não seriam adequadamente eliminados. O radical superóxido pode liberar ferro da ferritina presente nas membranas sinoviais, permitindo que o ferro2+ liberado catalise a formação de espécies mais oxidantes (radical hidroxila ou complexos ferro-oxigênio), as quais seriam iniciadoras da peroxidação lipídica e da degradação do ácido hipocloroso. Estudos *in vitro* demonstram que o ácido hipocloroso, formado pela mieloperoxidase dos neutrófilos, pode inativar a alfa 1-antiprotease do fluido sinovial e, ainda, que os radicais de oxigênio podem degradar proteoglicanos da cartilagem e causar lesões severas nas cartilagens. Apesar de vários fatores estarem envolvidos na destruição das cartilagens e na lesão óssea erosiva observada na artrite reumatóide, a lesão oxidativa, mediada por espécies reativas de oxigênio liberadas por células fagocíticas, pode ser um fator importante, desde que estudos recentes tenham observado uma relação entre a presença de marcadores de estresse oxidativo e dano em ADN de pacientes com artrite reumatóide.

***Envelhecimento.*** A natureza do processo de envelhecimento tem sido alvo de várias especulações. Existem duas principais linhas teóricas que tentam explicar o envelhecimento: a que considera o envelhecimento como um processo geneticamente programado e a que considera o envelhecimento como resultante do acúmulo de lesões no organismo, ao longo do tempo. Deve-se ressaltar que, apesar de existir um potencial máximo de longevidade para as espécies, o período de vida de um indivíduo da espécie pode ser alterado por condições ambientais. Há também evidências de uma correlação inversa entre as taxas metabólicas basais de animais e seu período de vida, sendo que de uma forma geral, animais de maior porte que consomem menos oxigênio por unidade de massa corpórea, em relação aos animais de pequeno porte, têm maior potencial de longevidade.

A teoria do envelhecimento geneticamente programado propõe que este processo ocorra devido a uma seqüência proposital de eventos codificados pelo genoma. Evidências que suportam esta teoria são encontradas, por exemplo, em relação às síndromes de envelhecimento precoce (Hutchinson-Gilford e Werner) nas quais alguns genes têm efeito importante sobre o envelhecimento. Observou-se uma forte correlação positiva entre a eficiência dos processos de reparo do ácido desoxirribonucléico, ADN, e a longevidade das espécies que, juntamente com outras evidências, indicaria a existência de genes determinantes da longevidade. Cutler verificou que espécies com maior potencial de longevidade apresentam mecanismos de defesa antioxidante mais eficientes, comparadas às espécies com menor longevidade. Assim, a atividade da superóxido dismutase do fígado humano, expressa por unidade de taxa metabólica, é mais alta que a de outras espécies de primatas e outros mamíferos. Uma vez que a SOD tem semelhanças estruturais e de atividade em todas estas espécies, Cutler sugeriu que uma mudança na regulação gênica determine a síntese de altas concentrações de SOD em humanos, contribuindo para a longevidade da espécie.

As teorias relacionadas ao envelhecimento pelo acúmulo de lesões propõem que o acúmulo progressivo de lesões celulares ocorre porque os mecanismos de reparo são insuficientes para manter a sobrevivência indefinida das células. Nessa linha, encontram-se a teoria da catástrofe do erro e a teoria dos radicais livres. A primeira propõe que erros na transcrição do ácido ribonucléico, ARN, e sua translação a proteínas levariam ao acúmulo de proteínas alteradas não funcionais nas células, com a idade, atingindo níveis que ocasionariam uma falha completa das funções celulares. São fracas as evidências para o acúmulo de proteínas alteradas em altas concentrações na maioria dos tecidos de indivíduos normais. Além disso, a taxa de erro da síntese protéica parece não se alterar com a idade. Fibroblastos de pacientes com síndrome de Wemer (progeria) teriam maiores concentrações de proteínas anormais que fibroblastos de indivíduos normais. No entanto, um outro fator que poderia estar envolvido seria a deficiência da remoção das proteínas alteradas por proteases específicas.

A teoria dos radicais livres propõe que o envelhecimento resulta de lesões deletérias randômicas aos tecidos, que seriam induzidas por radicais livres. Em suporte a este conceito, sabe-se que a radiação ionizante produz radicais livres e acelera algumas características do processo de envelhecimento, apesar do envelhecimento induzido pela radiação não mimetizar o envelhecimento normal. Um outro ponto é que os radicais livres de oxigênio, que são produzidos normalmente no metabolismo celular, poderiam não ser seqüestrados na sua totalidade pelos

sistemas de defesa antioxidante e provocariam lesões nas células. Estudos demonstram que as defesas antioxidantes de alguns tecidos são suficientes apenas para protegê-los contra taxas normais de geração de radicais, mas que seriam insuficientes em casos de produção exacerbada de radicais livres. Assim, poderiam ocorrer lesões progressivas muito lentas que não seriam detectadas precocemente. As evidências para o envolvimento de radicais livres no envelhecimento, obtidas em diversos estudos em animais de experimentação, são indicadas pelo acúmulo de lipofuscina nos neurônios, pelo aumento exponencial de proteínas oxidadas em diversas células em função da idade, pela correlação direta entre a atividade de SOD e a longevidade potencial da espécie, assim como pela correlação inversa entre as taxas metabólicas basais dos animais e as longevidades das respectivas espécies (quanto mais rápido for o consumo de oxigênio por um organismo, maior será a probabilidade de geração de espécies reativas de oxigênio). Foi demonstrado que a expressão elevada da enzima antioxidante catalase no músculo cardíaco previne a disfunção do relaxamento de cardiomiócitos induzida pelo envelhecimento. Em relação à diminuição das defesas antioxidantes com a idade, há indicações de que algumas enzimas, assim como os sistemas de reparo que eliminam proteínas oxidadas diminuem com a idade.

Apesar das evidências de que a diminuição dos sistemas de defesa antioxidante estaria diretamente relacionada ao processo de envelhecimento, ainda não existem estudos prospectivos abrangentes, em humanos, que demonstrem essa relação causa-efeito.

## 5. ESTRATÉGIAS DE INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA

O planejamento adequado das estratégias de intervenção com substâncias antioxidantes implica responder a diversas questões:

1. Qual é a natureza das espécies radicalares lesivas envolvidas na fisiopatologia da doença?
2. Qual o mecanismo de ação do composto antioxidante? O antioxidante poderia atuar: (a) inibindo os processos de formação das espécies radicalares, interceptando seus precursores; (b) inibindo a ação das espécies radicalares, seqüestrando-as e impedindo a indução das lesões; (c) suprimindo a amplificação da lesão inicial através do seqüestro de radicais secundários derivados e bloqueio da ação destes sobre outros componentes celulares?
3. A substância antioxidante, após exercer sua ação, transforma-se em radical potencialmente tóxico? Os produtos não radicalares derivados do antioxidante acumulam-se no organismo (p.ex., quinona da vitamina E)?
4. Qual é o sítio de origem das espécies radicalares? É possível o acesso do agente antioxidante ao local de geração destas espécies?
5. Se o antioxidante atuar extracelularmente, qual será sua meia-vida plasmática? Ficará na circulação tempo suficiente para exercer proteção antioxidante efetiva?
6. No caso da substância antioxidante atuar intracelularmente, qual o mecanismo de entrada da mesma na célula e quais são seus sítios específicos de ação?
7. Desde que espécies reativas participem de processos fisiológicos da célula, como o antioxidante irá afetar estes eventos e quais as conseqüências para o metabolismo celular normal?

Diversas estratégias têm sido utilizadas para aumentar a eficiência terapêutica dos compostos antioxidantes, dentre as quais se ressalta o aumento dos níveis de antioxidantes plasmáticos ou intracelulares, incorporação de antioxidantes lipofílicos em membranas e lipoproteínas e o *targeting* dos seqüestradores de radicais livres e antioxidantes.

### 5.1. Compostos seqüestradores de radicais livres como potenciais agentes terapêuticos

Várias substâncias têm sido utilizadas como seqüestradores de radicais livres e antioxidantes em estudos *in vitro* e *in vivo*, com potencial aplicação futura no tratamento de diversas doenças.

***Compostos Contendo Grupos tiol.*** A N-acetil cisteína (NAC) e a 2-mercaptopropionil glicina atenuam as disfunções contráteis que ocorrem após períodos curtos de isquemia, quando administradas imediatamente antes da reperfusão. Ambas as substâncias têm sido usadas em humanos, sendo a N-acetil cisteína a terapia utilizada na intoxicação por paracetamol. Estudos clínicos duplo cego realizados no Japão e na Europa mostram que a N-(2-mercapto) propionilglicina, ou tiopronina, é benéfica no tratamento da hepatite crônica, catarata senil e artrite reumatóide. Esses compostos tiólicos atingem o meio intracelular e são fontes potenciais de equivalentes redutores. A NAC é um doador de grupo sulfidrila facilmente transportado para o interior das células, onde é desacilada e

aumenta o pool de tióis, primariamente, a concentração de glutationa reduzida. Durante a isquemia, as defesas antioxidantes, particularmente as enzimas, ficam comprometidas e a maior produção de radical superóxido e peróxido de hidrogênio pode afetar os mecanismos de detoxificação de peróxidos. Como a atividade da catalase é muito baixa no miocárdio, a glutationa peroxidase é a principal enzima que atua na eliminação de peróxidos, e a manutenção de níveis adequados de glutationa reduzida torna-se essencial. Foi demonstrado que a NAC é capaz de reduzir a progressão do ateroma em modelos animais de aterosclerose através da diminuição do estresse oxidativo. Devido à sua atividade redutora, a NAC também pode modificar a atividade de diversas proteínas e inibir fatores de transcrição como p38 MAP kinase e NF-kB, podendo interferir na expressão de diversos genes. Em estudos preliminares em humanos, submetidos a cirurgias onde ocorreu *bypass* cardiopulmonar, a NAC demonstrou efeito cardioprotetor, embora a verdadeira extensão da sua eficiência terapêutica ainda seja desconhecida. A NAC tem eficiência comprovada na intoxicação por paracetamol, reconhecida como uma condição secundária à lesão por espécies reativas de oxigênio. Apresenta ampla janela tóxica-terapêutica, sendo considerada bastante segura e atua tanto por seu grupo sulfidrila reduzido, quanta pela qualidade precursora da glutationa. A NAC seqüestra peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso, protegendo alfa-antiproteases. A N-acetil cisteína na forma amídica (AD4) é um novo composto tiólico com atividade antioxidante por quelação de $Cu^{2+}$. O AD4 atravessa as membranas celulares e repõe os níveis de GSH com maior eficiência do que a NAC. Além disso, AD4 se incorpora no sistema redox da célula conferindo proteção contra oxidação celular. O AD4 pode ser uma estratégia terapêutica em potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas e outras disfunções associadas ao estresse oxidativo.

A eficácia da N-2-mercaptopropionil glicina, MPG, na proteção da lesão por reperfusão foi demonstrada em alguns estudos com animais, onde atuou como seqüestradora dos radicais superóxido e hidroxila. Em estudos-modelo, a MPG foi menos eficiente que a NAC em suprimir a peroxidação lipídica induzida por espécies ferril da mioglobina. A MPG apresenta leve toxicidade, provavelmente pela formação de radicais tiil (MPG-S•) ou peroxissulfenil (MPG-SOO•) que podem lesar constituintes celulares. Tanto a NAC como a MPG geram radicais tiil, quando adicionadas aos miócitos cardíacos lesados em condições de estresse oxidativo (presença de peróxido de hidrogênio). A formação dessas espécies pode limitar os efeitos benéficos da utilização de tióis nas intervenções com antioxidantes. Enquanto o sistema da glutationa peroxidase é um importante sistema de defesa antioxidante celular, tentativas de incrementar ou substituir esses sistemas com fontes exógenas de tióis como equivalentes redutores podem não resultar em proteção eficiente.

O captopril, composto sufidrílico inibidor da enzima conversor da angiotensina, tem efeitos cardioprotetores na isquemia miocárdica aguda, isquemia/reperfusão e infarto. Essa ação protetora seria devida à sua ação antioxidante devido à presença do grupo tiol, como demonstrado por estudos comparativos com um isômero do captopril, que é 100 vezes menos potente como inibidor da enzima conversora, mas eqüipolente em seqüestrar radical superóxido via grupo tiol e com enalaprilato, que não tem grupo tiol, mas inibe a enzima conversora. Foi recentemente observado que captopril inibe modificações oxidativas da LDL, tendo, portanto, papel protetor aterosprotetor. Estudos experimentais demonstram que o captopril reduz o tamanho do infarto, a incidência de arritmias na reperfusão e melhora a função contráctil do miocárdio. Devido à sua capacidade de reduzir a dilatação ventricular esquerda, quando administrado cronicamente após infarto do miocárdio, esse fármaco tem sido testado em estudos clínicos como terapia adjuvante à trombólise.

O ácido lipóico é um composto tiólico que, apesar de ser encontrado em baixas concentrações no organismo, possui diversas propriedades antioxidantes, incluindo ação direta contra os radicais livres, quelação de metais de transição e a regeneração de outros antioxidantes endógenos, como a redução do radical α-tocoferil para α-tocoferol, e de GSSG para GSH. Estudos demonstram que o ácido lipóico pode reverter a perda de GSH observada no envelhecimento. Suplementação com ácido lipóico tem sido relacionada a efeitos antiinflamatórios, diminuição do estresse oxidativo induzido por diabetes experimental, sendo este composto recentemente apontado como um agente terapêutico em potencial para doenças crônicas que envolvam estresse oxidativo.

***Agentes Complexantes de Metais de Transição.*** Um grande número de compostos naturais e sintéticos atuam na quelação de metais, mediante complexação do metal com átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre, para formar um complexo. Os metais de transição formam complexos mais estáveis em comparação aos outros metais porque as suas camadas eletrônicas internas não estão completamente preenchidas e os elétrons estão disponíveis para participar da ligação entre o metal e o ligante.

Um grupo importante de quelantes é representado pela classe dos hidroxamatos. O composto mais conhecido desta classe é a desferrioxamina, que é um quelante de ferro (tri-hidroximato hexadentado), utilizado clinicamente para o tratamento da sobrecarga de ferro. Sua alta constante de ligação ao ferro permite a complexação equimolar de ferro, impedindo-o de catalisar a formação de radical hidroxila. Estudos experimentais com modelos de isquemia/reperfusão têm mostrado efeitos benéficos da administração da desferrioxamina na proteção do miocárdio, atribuídos à diminuição da geração de radical hidroxila. Entretanto, a entrada da desferrioxamina nas células é extremamente limitada e ocorre por pinocitose; essa proteção pode ser devida a outros efeitos da desferrioxamina. A porção tri-hidroxamato da desferrioxamina, centro envolvido na ligação com o ferro, pode mediar a transferência de elétrons às hemeproteínas ativadas pelo peróxido de hidrogênio (ferril, mioglobina e peroxidase) e ao radical superóxido. A desferrioxamina pode interceptar radicais na fase de propagação da peroxidação de lipídeos da membrana, resultando na formação do radical nitróxido da desferrioxamina, que é relativamente estável. Radicais peroxil e alcoxil também podem ser seqüestrados pela desferrioxamina, o que poderia contribuir para os seus efeitos na atenuação da lesão miocárdica pós-isquêmica. A baixa penetração da desferrioxamina nas células limita sua ação ao meio extracelular. Compostos análogos, os mono-hidroxamatos, com propriedades farmacocinéticas mais favoráveis que a desferrioxamina têm sido sintetizados e testados em relação à eficiência de proteção na lesão por reperfusão. Dados preliminares indicam que alguns desses compostos apresentam potencial terapêutico.

A toxicidade de alguns compostos antibacterianos também é devida às interações ligante-metal. O mecanismo antibacteriano da isoniazida está relacionado à sua capacidade de complexar cobre, o que aumenta sua lipofilicidade e sua captação pelo *M. tuberculosis*. Além disto, a isoniazida é capaz de reduzir $Cu^{2+}$ a $Cu^{1+}$, favorecendo a formação de radicais livres catalisada pelo $Cu^{+}$.

Agentes anti-hipertensivos como a hidralazina, prizidilol, captopril, 2,3-dimercaptoetanol, dentre outros, também se complexam com metais de transição. Diversos agentes vasodilatadores contêm ligantes para metais de transição e inibem a peroxidação lipídica. A ação destes fármacos está relacionada à sua capacidade de ligar metais de transição presentes nas membranas celulares. Algumas membranas são ricas em grupos tióis que podem formar complexos lábeis com metais de transição, permitindo a complexação destes com os agentes vasodilatadores para formar complexos mais estáveis, o que diminui o poder redox dos metais, levando ao relaxamento do tônus vascular. Por este mecanismo, o tônus vascular pode ser modulado por um constante fluxo de elétrons, mediado por um centro de metal de transição redox ativo.

***Compostos Fenólicos de Plantas.*** Os polifenóis de plantas são compostos aromáticos hidroxilados, comumente encontrados em verduras e frutas, constituindo grande parte da nossa dieta. Esses derivados fenólicos são sintetizados pelas plantas como defesa antioxidante. Estudos *in vivo* e *in vitro* têm revelado inúmeras atividades biológicas para os polifenóis, incluindo antioxidante, antiviral e antibiótica. Dentre os polifenóis, os flavonóides representam a maior classe, com mais de 4.000 espécies identificadas. A ação antioxidante dos flavonóides pode se dar por quelação de metais de transição, ação direta contra os radicais livres através da transferência de átomos de hidrogênio ou doação de elétron, além de interação com outros antioxidantes. Tem sido recentemente demonstrado que flavonóides do chá melhoram a função endotelial em pacientes com doença coronariana. Flavonóides encontrados no suco de uva diminuem a susceptibilidade de oxidação da LDL, a agregação plaquetária e a produção de superóxido pelas plaquetas.

***Inibidores da Óxido Nítrico Sintase.*** O radical óxido nítrico é um vasodilatador e age ativando a forma solúvel da guanilato ciclase presente nas células musculares lisas, através da formação de um complexo com o grupo *heme* da enzima, havendo um relaxamento destas células. Os agentes vasodilatores, como os nitratos, nitritos e nitroprussiato, ativam a guanilato ciclase devido à liberação de óxido nítrico. Entretanto, a produção exclusiva de óxido nítrico está relacionada à lesão causada por isquemia/reperfusão, provavelmente pela formação de peroxinitrito, podendo haver um efeito vasoconstritor paradoxal. A óxido nítrico sintase, NOS, está amplamente distribuída em diversos tecidos, inclusive no cérebro, que é bastante suscetível à lesão devido à isquemia/reperfusão. Durante a isquemia, a NOS é ativada pelo influxo de cálcio nas células ou por citocinas, havendo uma produção exacerbada de óxido nítrico, possível formação de peroxinitrito e posterior lesão oxidativa. A inibição da NOS é uma estratégia utilizada para prevenir lesões causadas pelo óxido nítrico/peroxinitrito. A N-nitro-L-arginina é um inibidor seletivo da NOS, que inibe a neurotoxicidade induzida pelo glutamato. O éster metílico da nitro-L-arginina, L-NAME, também é um

inibidor da NOS e reduz o volume do edema cerebral em animais de experimentação, assim como o efluxo de glutamato induzido pela lesão isquêmica.

***Captadores de Spin.*** Originalmente utilizados para a detecção de radicais livres, os captadores de spin (*spin traps*) constituem uma classe de compostos com potencial antioxidante terapêutico. O spin trap fenil terbutil-nitrona (PBN) tem papel protetor na isquemia-reperfusão, além de ser neuroprotetor. O PBN possui diversas atividades farmacológicas, incluindo a capacidade de seqüestrar radicais alcoxila, superóxido e hidroxila. Entretanto, desde que estudos *in vitro* determinaram que a capacidade do PBN como inibidor da peroxidação lipídica era fraca, outros mecanismos foram atribuídos para a sua ação protetora. Portanto, mais do que um antioxidante direto, o PBN pode exercer seu efeito benéfico através da diminuição na iNOS e mecanismos envolvidos na via de sinalização do NFkB e conseqüente ação antiinflamatória. Novos *spin traps* estão sendo desenvolvidos a partir de moléculas já conhecidas para facilitar a sua entrada nos microambientes celulares de maior produção de radicais livres. O NXY-059, um derivado do PBN, demonstrou ter efeito neuroprotetor em uma variedade de modelos animais.

## 5.2. Antioxidantes enzimáticos

***Superóxido Dismutase.*** A terapia com a superóxido dismutase (SOD) é utilizada em situações em que o aumento da geração de radical superóxido deve ser controlado. Pelo fato de várias fontes geradoras de superóxido estarem envolvidas na lesão de reperfusão pós-isquêmica, seria esperado que a administração de SOD e catalase antes da reperfusão arterial coronariana pudesse limitar as arritmias e reduzir a necrose tecidual. Estudos utilizando o modelo de oclusão da artéria coronária em cães mostraram efeitos positivos da SOD em limitar a lesão do miocárdio. Outros estudos indicam que esse efeito é transiente, não havendo redução da necrose alguns dias após a reperfusão, em relação aos controles. A natureza transiente dos efeitos benéficos da SOD indica que os radicais de oxigênio podem ser gerados por períodos mais longos além do início da reperfusão, continuando durante a evolução do infarto. Foi demonstrado o efeito da SOD na prevenção do vasoespasmo coronariano após angioplasia em cães, o que pode ser importante para controlar os episódios oclusivos após a angioplasia coronariana. Uma das dificuldades de interpretação de resultados é que os estudos utilizam diferentes delineamentos experimentais. A eficácia da SOD nesses sistemas deve ser avaliada por comparações rigorosas do tipo, dosagem e duração do tratamento com sistemas experimentais semelhantes. Uma das maiores limitações da terapia com a SOD é sua curta meia-vida no plasma (< 10 minutos) devido à sua rápida excreção pelos rins. Várias estratégias são utilizadas para aumentar a permanência da SOD no plasma, tais como ligação com outras proteínas e síntese de derivados da SOD por técnicas de engenharia genética.

Uma SOD ligada à imunoglobulina A foi preparada por engenharia genética, através da ligação de duas unidades de CuZn-SOD humana à região de dobradiça da IgA, aumentando a meia-vida plasmática do complexo para 145 minutos e limitando a sua filtração glomerular. A ligação covalente da SOD aos polímeros de polietilenoglicol (PEG) aumenta sua meia-vida para 18-40 horas, em ratos, tomando-a menos imunogênica e mais resistente à proteólise que a SOD nativa, além de facilitar o transporte transmembrana da SOD ativa para o interior das células. A encapsulação da SOD em lipossomos sintéticos também aumenta a atividade intracelular da SOD e sua meia-vida plasmática para 4 horas. Complexos Cu-Dips (ácido cobre (11)-3,5-diisopropil salicílico) e DF-Mn (manganês desferrioxamina) mimetizam a atividade da SOD em dismutar o radical superóxido, tendo as vantagens de poderem atravessar as membranas celulares e ser menos imunogênicos que a SOD. Entretanto, ambos são limitados porque podem sofrer dissociação levando à toxicidade por liberação do cobre e do manganês. A associação da catalase com a SOD, ambas ligadas ao polietilenoglicol, tem sido utilizada em alguns estudos experimentais, mas os resultados ainda são discordantes. A utilização terapêutica da SOD, assim como a eficácia clínica dessas diferentes preparações, devem ser validadas mediante estudos mais amplos e rigorosamente controlados.

## 5.3. Outros fármacos

***Probucol.*** O probucol é conhecido como um potente agente antiaterosclerótico e antioxidante, redutor do colesterol, porém com o efeito indesejável de diminuir o HDL-colesterol. Embora o probucol tenha sido retirado do mercado há alguns anos, outros estudos subseqüentes demonstraram a eficácia do probucol em humanos, inibindo a aterosclerose na artéria carótida. O AGI-1067 é um derivado do probucol com atividade antioxidante que inibe seletivamente a expressão gênica inflamatória redox sensível, em monócitos e endotélio *in vitro*, diminui o LDL-colesterol, diminui a expressão de moléculas de adesão *in vivo* e inibe a aterosclerose em camundongos ApoE -/-.

***Alopurinol.*** Atua inibindo a atividade da xantina oxidase. O alopurinol é oxidado pela enzima aoxipurinol, o qual liga-se ao sítio ativo da enzima promovendo sua inibição ("substrato suicida"). É um fármaco amplamente utilizado na clínica médica para inibir o acúmulo de ácido úrico em condições como a gota. O alopurinol demonstrou efeito protetor na conservação de órgão para transplante, especialmente os rins. A administração de alopurinol em humanos aumenta a concentração plasmática de oxipurinol, que pode seqüestrar o radical hidroxila e o ácido hipocloro, contribuindo indiretamente para os efeitos protetores atribuídos ao alopurinol. O alopurinol tem sido utilizado na clínica por meio século, entretanto, novos inibidores de xantina oxidase mais potentes que o alopurinol, estão em desenvolvimento. Dentre esses novos compostos estão o febuxostato e o Y700, que é menos tóxico e tem alta biodisponibilidade.

## 6. BIBLIOGRAFIA


AGAMEY, A.; LOWE, G.M.; McGARVEY, D.J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D.M.; TRUSCOT, T.G.; YOUNG, A.J. Carotenoid radical chemistry and oxidant/pro-oxidant properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.430, p.37-48, 2004.

ALTINDAG, O.; KARAKOC, M.; KOCYIGIT, A.; CELIK, H.; SORAN, N. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Biochem,* v.40, p.167-71, 2007.

ANDERSON, T.J.; MEREDITH, I.T.; GANZ, P.; SEL WYN, A.P.; YEUNG, A.C. Nitric oxide and nitrovasodilators: similarities, differences and potential interactions. *J. Am. Coll. Cardiol.*, v.24, p. 555-66, 1994.

BECKMAN, J.S.; YE, Y.A.; ANDERSON, P.G.; CHEN, J; ACCAVITTI, M.A.; TARPEY, M.M.; WHITE, C.R. Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immnohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler,* v.375, p.81-8, 1994.

BLAKE, D.; WINYARD, P.G. *Immnopharmacology of free radical specjes*, New York: Academic Press, 1995. 301p.

BURDON, R.H. Superoxide dismutase and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Rad. Biol. Med.*, v18, p.775-94, 1995.

BURTON, G.W. Vitamin *E:* molecular and biological function. *Proc. Nutr. Soc.*, v53, p.251-62, 1994.

DAVIES, M.J. Synglet oxygen mediated damage to proteins and its consequences. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.305, p.761-70, 2003.

DIETRICH, M.; TRABER, M.G.; JACQUES, P.F.; CROSS, C.E.; HU, Y.; BLOCK, G. Does gamma-tocopherolplay a role in the primary prevention of heartdisease and cancer? A review. *J. Am. Coll. Nutr.*, v.25, p.292-9, 2006.

EMERIT, I. Reative oxygen species. chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, v.16, p.99-109, 1994.

EVANS, M.D.; PRYOR, W.A. Cigarette smoking. emphysema, and damage to $\alpha_1$-proteinase inhibitor. *Am. J. Physiol.*, v.266, L593-611, 1994.

FINKEL, T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.15, p.247-254, 2003.

GERSTER, H. Review: Antioxidant protection ofthe ageing macula. *Age Aging,* v.20, p.60-90, 1991.

GREENW ALD, R. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agentsfor human disease a critical review. *Free. Rad. Biol. Med.*, v.8, p.201-9, 1990.

GRIENDLING, K.K.; FITZGERALD, G.A. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation,* v.108, p.2034-40, 2003.

GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in disease processes: a compilation of cause and consequence. *Free Rad. Res. Comms.*, v.19, p.141-58, 1993.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford: Claredon Press, 1991. 543p.

HARMAN, D. Free radical Theory of aging: un update. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1067, p.10-21, 2006.

JANERO, D.R. Therapeutic potential of vitamin E in the pathogenesis of spontaneous atherosclerosis. *Free Rad. Biol. Med.*, v.11, p. 129-44, 1991.

KRINSKI, N.I. Effects of carotenoid in cellular and animal systems. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.53, n.1, p238-246, 1991. Review.

LAUGHREA, M. On the error theories of aging. A review of experimental data. *Exp. Gerontol.*, v.17, p. 305-15, 1982.

LEE, C.K.; PUGH, T.D.; KLOPP, R.G.; EDWARDS, J.; ALLISON, D.B.; WEINDRUCH, R.; PROLLA, T.A. The impact of alpha-lipoic acid, coenzyme Q10, and caloric restriction on life span and gene expression patterns in mice. *Free Rad. Biol. Med.*, v.36, p.1043-57, 2004.

MADAMANCHI, N.R.; VENDROV, A.; RUNGE, M.S. Oxidative stress and vascular disease. *Arteriosc. Thromb. Vasc. Biol.*, v.25, n.1, p.29-38, 2005. Review.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. *Curr. Opin Lipidol.*, v.16, p.77-84, 2005.

MARCZIN, N.; EL-HABASHI, N.; HOARE, G.S.; BUNDY, R.E.; YACOUB, M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.420, p.222-36, 2003.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide physiology pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p. 109-42, 1991.

PACHER, P.; NIVOROZKIN, A.; SZABO, C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacol. Rev.*, v.58, p.87-114, 2006.

PATWARI, P.; LEE, R. Thioredoxins, mitochondria, and hypertension. *Am J. Pathol.*, v.170, p.805-8, 2007.

REITER, R.J. Antioxidant capacity of melatonin: a novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol.*, v.15, p.103-16, 1993.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: an historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Rad. Biol. Med.*, v.38, p.1543-52, 2005.

RICE-EVANS, C.A.; DIPLOCK, A.T. Current status of antioxidant therapy. *Free Rad. Biol. & Med.*, v.15, p.77-96, 1993.

ROSEN, G.M.; POU, S.; RAMOS, C.L; COHEN, M.S.; BRITI-GAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.*, v.9, n.2, p.200-9, 1995.

RUSH, J.W.E.; DENNIS, S.G.; GRAHAM, D.A. Vascular nitric oxide and oxidative stress: determinants of endothelial adaptations to cardiovascular disease and to physical activity. *Can J Appl Physiol.*, v.30, p.442-74, 2005.

SALDEEN, K.; SALDEEN, T. Importance of tocopherols beyond a-tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutr Res.*, v.25, p.877-889, 2005.

SATO, M.; BREMNER, I. Oxygenfree radicals and metallothionein. *Free Rad. Biol. Med.*, v.14, p. 325-37, 1993.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. *Angw. Chem. Int.*, v.25, p.1.058-71, 1986.

SUN, Y. Free radicals, antioxidant enzymes and carcinogenesis. *Free Rad. Biol. Med.*, v.8, p. 583-99, 1990.

ZELKO, N.I.; MARIANI, T.J.; FOLZ, R.J. Superoxide dismutase multigene family:a comparison of the Cu-Zn (SOD1), Mn-(SOD2), and EC-(SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Rad. Biol. Med.*, v.33, p.337-349, 2002.

# 1.5.

# Avaliação da Toxicidade

*Silvia Berlanga de M. Barros* e *Solange C. Davino*

SUMÁRIO

1. Introdução
2. Relação dose-resposta e concentração-resposta
3. Tipos de testes toxicológicos
   3.1. Informações preliminares
   3.2. Estudos de toxicidade aguda
   3.3. Estudos de toxicidade subcrônica
   3.4. Estudos de toxicidade crônica
   3.5. Estudos de mutagênese e carcinogênese
   3.6. Estudos de desenvolvimento – reprodução e embriofetotoxicidade
   3.7. Estudos de toxicocinética
   3.8. Estudos de efeitos locais sobre a pele e os olhos
   3.9. Estudos de sensibilização cutânea
   3.10. Estudos de ecotoxicidade
4. Bibliografia

## 1. INTRODUÇÃO

Toda substância, segundo a Toxicologia, pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e freqüência de exposição (doses únicas ou múltiplas) e via de administração (respiratória, oral, dérmica, parenteral). Desta forma, faz-se necessário conhecer as condições de uso seguro de substâncias químicas para a saúde humana e ambiental. Em princípio, se de um lado, todas as substâncias podem ser potencialmente tóxicas, por outro, todas as substâncias podem ser usadas de forma segura, desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de tolerância. Quando não for possível definir um limite de tolerância, a exposição deve ser evitada.

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano grave ou morte. Para que este dano ocorra é indispensável a interação do agente químico com o organismo. A relação entre a intensidade do efeito, a concentração e o tempo de exposição, depende da idade e das condições de saúde do indivíduo ou organismo exposto. Em virtude do embrião e o feto serem particularmente sensíveis, as gestantes devem tomar cuidados especiais, evitando a exposição a substâncias potencialmente tóxicas. Uma substância altamente tóxica promoverá um efeito tóxico quando empregada em pequenas quantidades, enquanto que substâncias de baixa toxicidade necessitam de altas doses para promoverem esse mesmo efeito. Entretanto, algumas substâncias com baixa toxicidade aguda podem promover efeitos carcinogênicos ou teratogênicos em doses que não produzam qualquer efeito tóxico agudo.

Os efeitos tóxicos produzidos por substâncias químicas em sistemas biológicos só se manifestam se o agente tóxico ou um produto de sua biotransformação alcançar locais específicos do organismo em concentração e tempo suficientes para produzir o efeito. Muitas substâncias químicas são relativamente pouco tóxicas em sua forma nativa, enquanto outras pela ação de enzimas do organismo são convertidas a formas intermediárias que interferem na fisiologia celular. A ocorrência da resposta tóxica é, portanto dependente das propriedades químicas e físicas da substância, da condição de exposição e da susceptibilidade do sistema biológico ou do indivíduo. Assim, para caracterizar o potencial de perigo de um agente químico é necessário conhecer-se não apenas que tipo de efeito produz e a dose necessária para produzir este efeito, mas também considerar as informações sobre o agente, a exposição e a sua cinética no organismo. Deste modo, os fatores mais importantes que influenciam a toxicidade em relação a situação a um local específico são a via de administração e a duração e freqüência da exposição.

A exposição é função da dose (ou concentração) do agente químico envolvido e do tempo de interação com o organismo. A exposição implica na interação do agente químico com o organismo de modo a poder exercer o seu efeito no plano tecidual e celular. Para as substâncias altamente tóxicas a exposição tolerável deve ser próxima de zero.

Um dos maiores problemas na definição do nível de exposição tolerável está em se estabelecer o que deve ser considerado como dano ou efeito adverso. A avaliação da exposição é realizada pela medida da dose administrada ou da concentração a que um organismo vivo é submetido.

Um efeito adverso ou tóxico é definido como uma alteração anormal, indesejável ou nociva após exposição a substâncias potencialmente tóxicas. A morte é o efeito adverso mais drástico. Efeitos adversos de menor gravidade incluem alteração no consumo de alimentos, variação no peso corpóreo ou de órgãos, alterações anátomo-patológicas ou de níveis enzimáticos.

Os organismos vivos apresentam a capacidade de responder a variações externas, de modo a manter sua função normal. Este processo, conhecido como homeostasia, permite que os organismos vivos, por meio de modificações bioquímicas, morfológicas e de seus mecanismos fisiológicos, se adaptem às condições adversas de exposição sem manifestação de toxicidade. Entretanto, essa capacidade é limitada e quando os mecanismos de adaptação são sobre passados o efeito tóxico se manifesta.

Muitas vezes a distinção entre efeito adverso (efeito patológico) e adaptação (alteração fisiológica) é extremamente difícil, devendo cada caso ser analisado em particular.

## 2. RELAÇÃO DOSE-RESPOSTA E CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA

*Dose*. O termo dose é empregado para especificar a quantidade da substância administrada a um organismo vivo, geralmente expressa por unidade de peso corpóreo. Dependendo da via de administração, a dose efetivamente absorvida pode não ser idêntica à administrada. Para se conhecer a dose efetiva que provoca um efeito adverso deve-se conhecer a sua toxicocinética, considerando-se as diferentes vias de exposição.

A concentração de um agente químico indica as quantidades a que os organismos vivos estão expostos.

Numa exposição a um agente químico, a dose/concentração necessária para produzir dano varia bastante dependendo de diversos fatores, entre eles, das propriedades físico-químicas das substâncias.

A relação dose-resposta descreve a relação entre as características de exposição e o espectro de efeitos tóxicos.

A relação dose/resposta ou concentração/resposta é representada por uma curva Gaussiana teórica, raramente encontrada na prática.

Essa curva é calculada estatisticamente a partir de observações de mortalidade após a exposição à doses/concentrações relacionadas da substância a ser testada. Essa curva é amplamente empregada para calcular a dose letal 50% ($DL_{50}$) ou a concentração letal 50% ($CL_{50}$).

Esses índices indicam, respectivamente, a dose ou a concentração de um agente químico, derivada de cálculos estatísticos, que pode causar a morte de 50% de uma dada população de organismos em condições experimentais definidas. Outro valor importante que pode ser derivado dessa relação é a dose ou concentração limite, ou seja, a dose mínima necessária para produzir uma resposta detectável numa população teste. Esses índices, por sua vez, são empregados para classificar e comparar a toxicidade entre substâncias químicas, porém seu valor para este fim é limitado.

A Comunidade Européia utiliza os seguintes critérios para classificação de toxicidade:

| Categoria | $DL_{50}$ oral para ratos (mg/kg peso corpóreo) |
|---|---|
| Muito tóxico | menor que 25 |
| Tóxico | de 25 a 200 |
| Nocivo | de 200 a 2.000 |

Os valores de $DL_{50}$ devem ser referidos com relação à via de exposição e excipiente, quando empregado, uma vez que estes dois parâmetros modificam a toxicocinética da substância, podendo, conseqüentemente, modificar a expressão do efeito tóxico. Os valores obtidos referem-se sempre à espécie animal que deve obrigatoriamente ser mencionada.

Para o estabelecimento da curva dose/resposta devem ser assumidas as seguintes afirmativas:

- a resposta é inequivocamente devida à administração da substância;
- a resposta deve de fato estar relacionada com a dose;
- a avaliação da resposta deve ser feita por métodos quantificáveis e expressar exatamente a toxicidade. Isto implica na escolha de *end points* que, preferencialmente, expressem eventos moleculares que resultam da exposição ao agente tóxico.

Os valores de $DL_{50}/CL_{50}$ não informam sobre o tipo de curva dose/concentração-resposta na qual se baseiam; além disso, há necessidade de um grande número de animais para haver dados estatísticos precisos. Os valores de dose/concentração limite são geralmente diferentes mesmo para substâncias que apresentem $DL_{50}/CL_{50}$ semelhantes, indicando que os mecanismos de ação são diferentes. As formas das curvas dose/concentração-resposta devem, portanto ser levadas em consideração quando se deseja proceder a um estudo de comparação da toxicidade. Os valores de $DL_{50}$ são geralmente expressos em quantidade da substância por quilo de peso corpóreo, podendo ser também expressos em quantidade da substância por $cm^2$ de área de superfície corpórea. Esta segunda forma de expressão é particularmente importante nos casos de extrapolação de dados entre os animais de diferentes tamanhos e de animais para o homem.

Os dados obtidos da curva dose-resposta são extremamente úteis para a seleção de dose para o desenvolvimento dos testes de exposição a médio e longo prazo.

A partir da curva dose/concentração-resposta além do cálculo da $DL_{50}$ e $CL_{50}$, é possível avaliar a dose ou concentração limite, ou seja, a dose mínima necessária para produzir uma resposta detectável numa população teste. O valor limite nunca pode ser estabelecido com precisão absoluta e, portanto, a menor dose que produz um efeito observável ou a dose em que não são observados efeitos tóxicos (NOEL) são usadas ao se estabelecer os padrões de regulamentação.

A tendência atual é a de substituir os experimentos e cálculos de $DL_{50}/CL_{50}$ pelo *teste de dose fixa*. No teste da dose fixa, a substância a ser testada é administrada a uma espécie animal numa dose específica: essa dose é selecionada a partir de doses previamente fixadas, as quais estão de acordo com classificações de instituições regulamentadoras, ou por sistemas de gradação.

Após a administração segue-se um período de 14 dias de observação. A dose na qual se observam sinais de toxicidade é usada para graduar ou classificar o material testado.

Segundo estudos retrospectivos de valores de $DL_{50}$, 80 a 90% dos compostos que produzem sinais de toxicidade, sem morte, nas doses de 5, 50 e 500 mg/kg de peso corpóreo, após administração por via oral, apresentavam valores de $DL_{50}$, mostrado nos mesmos estudos de respectivamente mais de 25, de 25 a 200 e de 200 a 2.000 mg/kg peso corpóreo conforme a classificação de toxicidade da Comunidade Européia.

Assim, recomenda-se que um grupo de 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) seja tratado com uma dose oral de 500 mg/kg de peso corpóreo. Se não houver sinais de toxicidade a substância não será classificada em nenhuma das categorias anteriormente mencionadas.

Se houver manifestação de toxicidade sem morte, a substância será classificada como nociva. Se houver morte procede-se a novo teste agora com a dose de 50 mg/kg de peso corpóreo. A substância será classificada como *tóxica* nos casos em que, com a dose menor, embora sejam detectados sinais de toxicidade, não se observe mortalidade entre os animais. Se com esta dose houver mortalidade entre os animais, a substância deve ser novamente avaliada na dose de 5 mg/kg de peso corpóreo. Nesse caso, se são observados sinais de toxicidade e/ou mortalidade, a substância deve ser classificada como *muito tóxica*.

No entanto, se com a dose de 500 mg/kg de peso corpóreo não foram observados sinais de toxicidade, é necessário que se teste a dose de 2.000 mg/kg de peso corpóreo, para a avaliação total de riscos.

A vantagem do teste de dose fixa reside na redução do número de animais e na possibilidade de minimizar o sofrimento dos animais, uma vez que não há necessidade de ocorrência de morte.

## 3. TIPOS DE TESTES TOXICOLÓGICOS

Além da curva dose/concentração-resposta é necessária, para se conhecerem os efeitos tóxicos de uma substância, a realização de testes toxicológicos. Esses testes, aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem estabelecer os possíveis efeitos das substâncias em humanos. Com relação a fármacos, os testes de toxicidade sucedem as triagens farmacológicas gerais e são feitos somente com fármacos que mostram efeitos farmacológicos úteis.

Em 1937, na Europa, houve intoxicação e morte de centenas de pacientes por dietilenoglicol, solvente utilizado na preparação de sulfanilamida. Registrou-se também, entre 1959 e 1961, a ocorrência de numerosos casos de deformações congênitas em crianças cujas mães haviam tomado talidomida no início da sua gravidez. Diante desses graves acidentes, as Instituições Governamentais, em diversos países, decidiram exigir maior rigor nos controles biológicos de fármacos e medicamentos, quanto a seus efeitos colaterais e tóxicos.

No Brasil, a Resolução 1/78 (*Diário Oficial* 17/10/78) do Conselho Nacional de Saúde estabelece cinco tipos de ensaios de toxicidade: aguda, subaguda, crônica, teratogenia e embriotoxicidade e estudos especiais.

Assim, esse conjunto de testes deve ser realizado para cada nova substância a ser utilizada ou produzida em larga escala, geralmente acima de 1 tonelada/ano. Entretanto, dependendo do uso da substância, do efeito tóxico produzido por estruturas análogas à substância química, bem como do efeito tóxico produzido pela substância em si, pode-se definir quais os testes que devem ser realizados em situações específicas.

A lista de estudos pode variar de um país para outro, mas basicamente inclui os seguintes tópicos:

- informações preliminares;
- toxicidade aguda;
- toxicidade subcrônica (curta duração);
- toxicidade crônica (longo prazo);
- mutagênese e carcinogênese;
- reprodução e embriofetotoxicidade;
- toxicocinética;
- efeitos locais sobre a pele e olhos;
- sensibilização cutânea;
- ecotoxicidade.

Dois princípios devem ser observados na realização dos testes toxicológicos em animais:

a. os efeitos produzidos pelo composto no animal de laboratório devem ocorrer também no homem;
b. a exposição de animais de experimentação a altas doses de um agente tóxico é um método válido e necessário para a descoberta dos efeitos danosos ao homem.

Os testes toxicológicos não são planejados para demonstrar que um agente químico é seguro, mas sim para caracterizar que tipo de efeito tóxico uma substância química produz.

### 3.1. Informações preliminares

As informações preliminares têm por objetivo conhecer a substância que será submetida aos estudos de toxicidade. Como a toxicidade está ligada à sua estrutura química, é fundamental que a substância em estudo seja quimicamente caracterizada. As impurezas, quando presentes, devem ser conhecidas quali e quantitativamente, uma vez que podem alterar a toxicidade. Muitas vezes o efeito tóxico manifestado deve-se às impurezas e não à substância em teste.

As propriedades físico-químicas devem ser determinadas, uma vez que delas vai depender o tratamento a ser dado à substância para a aplicação dos testes toxicológicos. Entre elas são fundamentais o conhecimento do odor, cor, pontos de fusão e ebulição, pressão de vapor, densidade, viscosidade, solu-

bilidade e volatilidade. Estas propriedades servirão para orientar quanto aos solventes, para a dissolução da amostra e via de administração, entre outros.

Devem ser incluídos, sempre que existirem, dentro das informações preliminares, dados relativos aos possíveis níveis de exposição da população à substância.

Estes dados permitem a condução de estudos toxicológicos dentro da realidade da exposição humana.

O conhecimento das propriedades físico-químicas das substâncias também tem papel fundamental em relação ao seu comportamento no meio ambiente, permitindo extrapolar qual a distribuição ambiental e quais partes do ecossistema seriam provavelmente afetados. Estas informações preliminares ajudam a predizer a mobilidade da substância no ambiente e a indicar qual sua provável distribuição entre o ar, água e solo. O coeficiente de partição e a lipossolubilidade, por exemplo, ajudariam a conhecer qual a extensão da absorção, distribuição e armazenamento na biota.

## 3.2. Estudos de toxicidade aguda

Toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. De modo geral, a dose única é utilizada para determinar a potência da substância em casos de ingestão ou envenenamento acidental e as doses múltiplas são usadas para avaliar os efeitos cumulativos. A via oral é indicada, mas outras vias de administração podem ser escolhidas, considerando-se a exposição humana.

Como já exposto anteriormente neste capítulo, os estudos de toxicidade aguda têm por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da $DL_{50}$. Este parâmetro, que representa a probabilidade estatística de uma dose causar efeito letal em 50% dos animais de uma população, é útil para identificar a toxicidade relativa da substância. A $CL_{50}$ (concentração letal média) é utilizada para testes de letalidade no caso de inalação ou para indivíduos no meio aquático.

Conforme ilustra a Figura 1, nos grupos que receberam baixas doses não se observam mortes. Nas doses intermediárias, parte do grupo morre e em altas doses, todos os animais do grupo morrem. Essas mortes podem ocorrer durante a exposição ou dentro do período estabelecido de observação após a exposição. A curva sigmóide obtida se aproxima mais da linearidade se a resposta for representada graficamente contra o logaritmo da dose. Essa curva se torna praticamente linear entre 16% e 84%, e assim pode-se obter o ponto médio, ou seja, a $DL_{50}$ (Figura 2).

Os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda servem também para conhecer-se o mecanismo de ação da substância, identificar possíveis órgãos ou sistemas sensíveis e determinar se os efeitos são reversíveis.

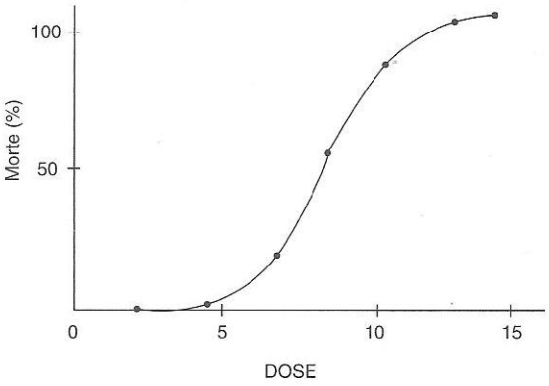



**Figura 1.** Dose resposta em teste de toxicidade.

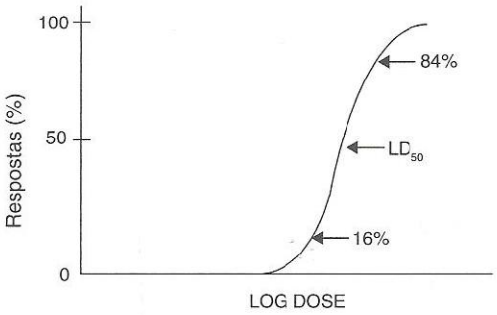



**Figura 2.** Log dose/resposta em teste de toxicidade.

É importante avaliar não apenas a quantidade de animais mortos, mas também o início, a natureza e a duração da intoxicação associada à morte.

Esses estudos devem incluir, além das observações clínicas, exames anátomo-patológicos, que auxiliam na caracterização de tecidos e órgãos-alvo.

As substâncias devem ser testadas em diferentes espécies/linhagens animais e em ambos os sexos, pois as diferenças de resposta indicam que o efeito tóxico não é universal e a extrapolação para o homem deve ser feita considerando-se essas diferenças.

Além disso, os resultados obtidos a partir dos estudos de toxicidade aguda são empregados para o delineamento dos estudos de toxicidade subcrônica, particularmente no que se refere à escolha de doses.

## 3.3. Estudos de toxicidade subcrônica

Os testes de toxicidade subcrônica são realizados para a obtenção de informações sobre a toxicidade

das substâncias químicas, após exposições repetidas. Esses estudos devem ter duração de pelo menos 21 dias, mas o tempo mais comum do teste é de 90 dias. É um estudo importante porque, às vezes, é o primeiro e o único teste com doses repetidas a ser realizado para determinadas substâncias químicas. Os principais objetivos dos testes de toxicidade subcrônica são os de estabelecer os níveis nos quais não se observam os efeitos tóxicos, identificar e caracterizar os órgãos afetados e a severidade após exposições repetidas. Também é importante examinarem-se os efeitos após o período de tratamento e determinar se este efeito é devido ao acúmulo da substância ou não. Outro aspecto importante é o de estabelecer se os efeitos tóxicos são reversíveis, determinando-se assim se o período de observação pós-tratamento é necessário ou não. O teste subcrônica também pode determinar se um efeito particular, por exemplo, neurotoxicidade, necessita posteriormente de testes específicos.

A via de administração é geralmente a oral devendo as eventuais vias de exposição humana serem consideradas. O teste deve ser realizado em pelo menos duas espécies animais, sendo uma não-roedora, utilizando pelo menos três doses.

Os animais devem ser examinados pelo menos uma vez ao dia durante todo o experimento, com relação à manifestação de sinais de toxicidade. Os parâmetros mais comuns referem-se a modificações no consumo de ração, no peso, na cor e textura dos pelos, alterações circulatórias e respiratórias, anormalidades motoras e de comportamento e aumentos macroscópicos de massas de tecidos. Nesses ensaios, sempre deverão estar incluídos um grupo controle negativo, que será tratado da mesma maneira que o grupo teste, menos o agente em teste.

Ao término do experimento, os animais sobreviventes serão sacrificados e retirados os órgãos para avaliação anátomo-patológica. Avaliações hematológicas e bioquímicas no sangue (balanço, eletrolítico, proteína, uréia, creatinina, enzimas de função hepática) são realizadas ao término do experimento mas, podem também ser feitas antes do início e no meio do ensaio.

Exames de urina são também recomendados no início, meio e término do experimento.

Os estudos de toxicidade subcrônica servem não apenas para caracterizar a relação dose/resposta após administrações repetidas, mas também para fornecer dados para escolha de doses nos estudos de exposição crônica. Os testes de toxicidade subcrônicos geralmente não avaliam o potencial carcinogênico.

## 3.4. Estudos de toxicidade crônica

Embora o estudo da toxicidade subcrônica com dados histopatológicos e estudos toxicocinéticos precisos possam fornecer valiosos subsídios sobre os efeitos tóxicos de determinadas substâncias químicas, existem várias limitações. Os testes subcrônicos, por exemplo, não são testes seguros para prever efeitos mutagênicos ou carcinogênicos e não têm por objetivo investigar os efeitos embriofetotóxicos.

Os estudos de toxicidade crônica são realizados para se determinar o efeito tóxico após exposição prolongada a doses cumulativas da substância em teste. Estes estudos permitem também observar o potencial carcinogênico da substância, desde que a dose escolhida seja correta.

Os estudos de toxicidade crônica seguem o protocolo dos estudos de toxicidade subcrônica, apenas diferindo quanto ao tempo de duração do teste, que deve ser superior a 3 meses. Em roedores, este tempo varia de 6 meses a 2 anos e em não roedores o tempo de tratamento é, em geral, de um ano. A escolha do tempo de tratamento depende do uso previsto da substância. Se o uso for por períodos curtos, 6 meses de tratamento podem ser suficientes. Se a substância for empregada por longo tempo, envolvendo contato crônico da população, o tempo de tratamento adequado seria o período de vida normal do animal usado para o teste.

Esses estudos são geralmente realizados em duas espécies animais (ratos e camundongos), por um período semelhante ao tempo de vida média destes animais (18 meses a 2 anos para camundongos e 2 a 2,5 anos para ratos). Normalmente são empregados 50 animais para cada dose e sexo, visando garantir um número adequado ao final do experimento (30 animais).

A escolha das doses é o ponto crítico dos testes de longa duração, para que não ocorra morte prematura devido ao tratamento.

Nos testes de toxicidade crônica os exames clínicos devem ser realizados cuidadosamente, duas vezes ao dia, evitando-se assim perdas por autofagia, após a morte dos animais. Dados como peso corpóreo, consumo de ração e sinais clínicos precisam ser anotados rigorosamente todas as semanas durante as 13 primeiras semanas do ensaio, a fim de se obter resultados coerentes com o início e a progressão dos efeitos tóxicos.

Parâmetros hematológicos como hematócrito, hemoglobina, contagem total e diferencial de leucócitos devem ser medidos no início do estudo e após 6 meses. Ao final do teste, os mesmos parâmetros devem ser avaliados em pelo menos 10 animais por grupo. Análise de urina e parâmetros bioquímicos de sangue também devem ser avaliados da mesma maneira que os parâmetros hematológicos.

Exames histopatológicos, à semelhança dos do teste de toxicidade subcrônica, também devem ser realizados.

### 3.5. Estudos de mutagênese e carcinogênese

Mutagênese refere-se à propriedade que as substâncias químicas apresentam de provocar modificações no material genético das células, de modo que estas sejam transmitidas às novas células durante a divisão. Dependendo da célula afetada, as mutações podem acarretar desde a inviabilidade de desenvolvimento da célula ovo, passando por morte do embrião ou feto até o desenvolvimento de anormalidades congênitas que podem ser transmitidas hereditariamente.

Vários testes *in vivo* e *in vitro* foram desenvolvidos para avaliar as propriedades mutagênicas das substâncias químicas. A principal finalidade da identificação destas propriedades reside na necessidade de se quantificar o perigo de lesão ao material genético e conseqüentemente a transmissão hereditária destas mutações.

Dos testes *in vitro*, um dos primeiros e mais empregados é o teste desenvolvido por Amcs, em 1975. Nesse teste é possível avaliar-se mutações puntuais em cepas mutantes de *Salmonella typhimurium* que carecem de uma enzima, a fosforribosil ATP sintetase, necessária para a síntese de histidina. Como algumas substâncias químicas são mutagênicas apenas após biotransformação, este teste foi modificado, introduzindo-se no meio de reação uma suspensão de microssoma hepático de ratos.

Os testes *in vivo*, realizados em animais, incluem a observação de danos a cromossomas de células de medula óssea em metáfase, o aparecimento de micronúcleos em linfócitos de sangue periférico e o teste do dominante letal. Este último avalia a capacidade da substância em produzir alterações nos espermatozóides de ratos tratados e a manifestação destas alterações na prole, após acasalamento com fêmeas não tratadas.

Esses testes têm a capacidade de avaliar o potencial mutagênico das substâncias, mas os resultados obtidos são de difícil uso para a extrapolação ao homem.

Os testes de mutagenicidade são, na maioria das vezes, empregados para prever o desenvolvimento de câncer, pois uma das teorias de carcinogênese química indica o desenvolvimento de uma mutação como evento inicial deste processo.

Assim, os testes de mutagênese têm sido empregados como testes de triagem para prever o potencial carcinogênico das substâncias; entretanto, eles apenas avaliam as substâncias que produzem câncer por mecanismos genotóxicos, isto é, que interagem diretamente com o material genético.

Existe um grande número de substâncias que produzem câncer por mecanismos não genotóxicos. Estas substâncias apresentam os testes de mutagênese negativos, não interagindo com o DNA. Alguns mecanismos de carcinogênese não genotóxica incluem citotoxicidade com regeneração, acompanhada de aumento na síntese de DNA, desbalanços hormonais, imunossupressores e promotores de expressão de oncogenes.

Desse modo, os testes de mutagênese não são suficientes para indicar o potencial carcinogênico de uma substância.

Testes de carcinogênese devem ser realizados, principalmente nos casos em que ocorra exposição humana a longo prazo.

Para os testes de carcinogênese a dose empregada é crucial, sendo indicado o uso da Maior Dose Tolerada, isto é, a dose que administrada aos animais durante o seu período médio de vida, não provoca morte dos mesmos e não produz uma diminuição de peso maior que 10%, quando comparado com animais controle. Embora, na maioria dos casos, estas doses sejam muito superiores àquelas relacionadas à exposição humana, elas são indicadas para garantir o aparecimento de tumores, se houver.

### 3.6. Estudos de desenvolvimento – reprodução e embriofetotoxicidade

A Toxicologia do Desenvolvimento estuda os efeitos adversos que ocorrem nos organismos em desenvolvimento, decorrentes da exposição a substâncias químicas antes da concepção, isto é, dos pais, durante o desenvolvimento perinatal ou pós-natal até a puberdade. A Toxicologia do Desenvolvimento engloba a embriofetotoxicidade e a Toxicologia da Reprodução. A embriofetotoxicidade estuda as alterações induzidas durante o desenvolvimento, entre a concepção e o nascimento, enquanto a Toxicologia da Reprodução se encarrega do estudo dos efeitos adversos que ocorrem nos sistemas reprodutores masculino e feminino resultantes da exposição a agentes químicos.

Os testes devem ser realizados de modo a avaliar a fertilidade e o desempenho para a reprodução, potencial teratogênico, toxicidade peri e pós-natal e efeitos sobre o sistema reprodutivo. Para cada um desses testes, diferentes condições de exposição são necessárias de modo a avaliar corretamente o parâmetro em estudo. Por exemplo, machos tratados com determinadas drogas são acasalados com fêmeas não-tratadas ou vice-versa, ou ambos os sexos são

tratados antes do acasalamento. Nos machos o ciclo inteiro da espermatogênese deve ser coberto. O crescimento e o desenvolvimento do embrião são extremamente importantes. Para testar efeitos teratogênicos, a substância em estudo deve ser administrada em animais testes que estejam prenhes (geralmente camundongos, ratos ou coelhos) em altas doses durante o período de organogênese. Para detectar os efeitos embriogênicos, a substância deve ser administrada durante a gestação em doses menores. Em ambos os casos, o conteúdo do útero é estudado. Outros efeitos no ciclo reprodutivo requerem estudos nas gerações posteriores.

## 3.7. Estudos de toxicocinética

Os estudos de toxicocinética dão informações sobre a absorção, distribuição, armazenamento, biotransformação e excreção da substância. Embora bastante complexos, estes estudos são recomendados, pois permitem avaliar diferenças de comportamento das substâncias em diferentes espécies animais e prever o seu comportamento no homem, uma vez conhecidas as diferenças de metabolismo entre essas espécies. Sabe-se hoje que muitas substâncias químicas exercem efeitos tóxicos através de seus produtos de biotransformação, que podem ser conhecidos pelos estudos de toxicocinética. A atividade de várias enzimas como oxidases de função mista, hidrolases, glutationa-S-transferase e glicuronil-transferases varia entre espécies animais. As concentrações tissulares de substâncias detoxificantes como a glutationa têm efeitos importantes na toxicidade e essas substâncias também variam entre espécies. Existem diferentes tipos de receptores hormonais, outras moléculas regulatórias e concentrações tissulares de receptores que são diferentes quando comparados com as espécies animais e o ser humano. Outra diferença é que as espécies animais menores, como camundongos, ratos e hamsters, geralmente metabolizam as substâncias químicas tóxicas mais rapidamente que as espécies maiores como o cão, macacos e o homem. A dose é importante, principalmente quando é alta e administrada cronicamente. Sob estas condições, os mecanismos de proteção e as reações enzimáticas podem estar diminuídos ou inativados, enquanto que o metabolismo de catálise pode estar aumentado. Várias substâncias interferem na atividade de enzimas de biotransformação, quer de fase I quer de fase II, tanto inibindo como aumento suas atividades com conseqüente variação no metabolismo da própria substância ou de substância administradas concomitantemente.

Na extrapolação de dados de animais para o homem, diferenças e similaridades no metabolismo de uma substância química devem ser consideradas na avaliação de risco.

Atualmente, o conhecimento das diferenças existentes entre as vias metabólicas de diferentes espécies animais e a do homem, tem servido de base para a previsão da toxicidade em humanos, baseado nos estudos de toxicocinética em animais.

## 3.8. Estudos de efeitos locais sobre a pele e os olhos

Dependendo da exposição humana prevista, a avaliação dos efeitos diretos da substância sobre olhos e pele deve ser realizada, por exemplo, no caso de cosméticos ou de exposições acidentais a estas substâncias.

O animal de escolha para este teste é o coelho (para pele e olhos) e ocasionalmente a cobaia (para pele). Estas espécies tendem a ser mais sensíveis aos agentes químicos e, assim, exagerando nos riscos podem colaborar com a maior margem de segurança.

Os parâmetros avaliados referem-se à irritação que a substância provoca sobre a pele, intacta ou não, e sobre os olhos. Draize, em 1944, propôs o teste que leva o seu nome e é, ainda hoje, empregado para avaliar a irritação causada por substâncias químicas sobre a pele e os olhos. Para a pele, os parâmetros avaliados são eritema, escara, edema e corrosão. Para os olhos, observam-se alterações da conjuntiva, córnea, íris e cristalino. Existem 3 tipos de testes de irritação:

a. irritação local ou aguda (resposta reversível e local) resultante da resposta de uma aplicação única ou exposição a um agente tóxico;
b. em casos especiais, irritação cumulativa (resposta dérmica de exposição repetida à substância);
c. irritação induzida fotoquimicamente (uma irritação primária resultante de luz induzindo modificações moleculares na pele exposta).

A irritação não reversível é a que persiste por mais de 14 dias após a exposição. O teste de irritação primária tem o objetivo de avaliar o potencial de risco de uma única dose simples de uma substância química de causar uma lesão reversível ou permanente.

## 3.9. Estudos de sensibilização cutânea

Informações sobre a capacidade de uma substância em induzir reações de sensibilização cutânea são necessárias quando houver possibilidade de contatos repetidos da substância com a pele. Esses testes são geralmente realizados em coelhos ou em cobaias, submetidos a tratamento com doses repetidas da substância, com ou sem adjuvantes, por um período de uma a duas semanas.

Após duas ou três semanas da última exposição, os animais são submetidos a uma dose não irritante da substância e o aparecimento de eritema é monitorizado. De maneira geral, os testes de sensibilização da pele podem ser classificados em dois tipos:

a. teste envolvendo o uso concomitante de Adjuvante Completo de Freund (ACF), um imunopotenciador ou facilitador de sensibilização. Um dos testes mais importantes é o teste de maximização de Magnusson e Kligmann, que combina o ACF e laurel sulfato de sódio em aplicações tópicas oclusivas e injeções intradérmicas da substância teste durante o período de sensibilização;
b. teste sem a utilização do adjuvante empregado para avaliação da intensidade da resposta após teste de adjuvante.

Deve-se ter cuidado na avaliação e interpretação dos resultados de sensibilização cutânea, para minimizar os erros quando da extrapolação dos dados a humanos, pois às vezes um resultado positivo pode ser devido a presença de traços de impureza.

## 3.10. Estudos de ecotoxicidade

Toxicologia ambiental e ecotoxicologia são termos usados para descrever o estudo dos efeitos adversos em organismos vivos causados pelas substâncias químicas quando liberadas no meio ambiente. Na verdade, existe uma distinção entre esses dois termos e o termo ecotoxicidade é utilizado apenas para o estudo dos efeitos tóxicos no ecossistema e seus componentes.

No meio ambiente um grande número de substâncias potencialmente tóxicas está presente, sendo que muitas delas em concentrações que isoladamente não causam danos, porém a sua interação com outros agentes químicos pode resultar em dano.

As condições climáticas também afetam profundamente a natureza e os efeitos da exposição a substâncias potencialmente tóxicas. Assim, uma avaliação de dano realizada em um determinado local pode não ser aplicável em outro, onde as condições climáticas sejam muito diferentes. Podemos citar o caso da produção do *smog* fotoquímico, fenômeno em que os hidrocarbonetos e óxidos de nitrogênio, sob a influência da luz ultravioleta irradiada pelo sol, e na presença de oxigênio, interagem formando nitratos de peroxiacila que são muito mais tóxicos que os seus precursores. Outros exemplos podem ser citados, como o aumento da temperatura e as enchentes. O aumento da temperatura devido à luz solar excessiva leva ao aumento de vaporização dos agentes químicos na atmosfera e estes, sendo dispersados através da atmosfera, possibilitam a absorção por via respiratória pela inalação. Outro problema causado pelo aumento da temperatura é a diminuição da excreção renal em mamíferos, causando retenção de substâncias potencialmente tóxicas devido ao armazenamento. As enchentes facilitam a liberação das substâncias ligadas aos colóides no solo, bem como a disseminação das substâncias potencialmente tóxicas de áreas contaminadas para terras e poços de água circunvizinhos. Nessas situações, a água potável pode sofrer contaminação.

Assim, sendo impossível prever exatamente o que irá acontecer, torna-se necessária a monitoração das substâncias químicas quando em contato com o meio ambiente. A monitoração química, ou seja, a análise química de amostras ambientais realizadas de acordo com métodos previamente estabelecidos na avaliação de risco permite verificar a distribuição do agente químico fornecendo informações relativas a qualquer transformação desses agentes em produtos de maior ou menor toxicidade, podendo também fornecer informações prévias da localização e do acúmulo de substâncias potencialmente nocivas ou de seus derivados.

O planejamento da amostragem, a escolha de métodos de extração e análise apropriados são alguns dos problemas a serem enfrentados na monitoração ambiental. A seleção dos agentes químicos a serem monitorados deve levar em consideração os produtos de degradação e outras substâncias que possam aumentar ou reduzir a sua toxicidade. Os métodos de extração devem ser avaliados quanto à sua eficácia e relevância relativa às possíveis vias de absorção; algumas vezes os métodos de extração podem confirmar a presença de substâncias químicas sob forma biologicamente não disponível.

Os estudos de ecotoxicologia incluem também a monitoração biológica, que consiste em avaliar os organismos expostos visando detectar efeitos adversos que possam indicar a exposição em níveis tóxicos de substâncias no ambiente, ou avaliar as substâncias químicas com relação aos efeitos produzidos por meio da monitoração de indicadores de deficiências enzimáticas ou genéticas.

Existem vários exemplos clássicos de monitoração biológica em ecotoxicologia: um deles é o da observação de populações de pássaros predadores que levou a descoberta da biomagnificação, na cadeia alimentar, de hidrocarbonetos organoclorados, tais como DDT e seus efeitos no comportamento de pássaros, na espessura da casca de ovos e dos efeitos negativos na sua reprodução. A morte de abelhas produtoras de mel, relatada pelos apicultores, pode ser um aviso sobre o uso excessivo de praguicidas.

Outro exemplo é o do uso de líquens para monitorar a poluição por dióxido de enxofre: espécies diferentes apresentam diferentes susceptibilidades a dióxido de enxofre e sua distribuição ambiental reflete a poluição por este gás.

Existe uma lista de fatores a ser considerada ao se avaliar o risco ambiental de uma dada substância química: químicos (possíveis estados de oxidação, interações com outros materiais e impurezas, vias e produtos de degradação e biodisponibilidade, forma física), potencial de biodegradação (demanda biológica e química de oxigênio, variação de temperatura, disponibilidade de oxigênio e biodegradação de produtos de interação), testes de toxicidade aguda (microorganismos, plantas superiores, invertebrados, peixes, pássaros e mamíferos) e toxicidade crônica (espécies de peixes, cadeia alimentar de invertebrados e mamíferos mais significativos), desaparecimento da atmosfera, águas de rios, lagos, solo, bioacumulação em microorganismos, plantas superiores, invertebrados, peixes, pássaros, mamíferos e humanos, eutroficação, ou seja, excesso de nutrientes em águas naturais (ensaios laboratoriais da resposta em algas e outras plantas aquáticas), solos, lodo e sedimentos (acumulação e liberação de outros materiais por reações de troca ou pela modificação do meio) e efeitos físicos (radiações).

Existe uma lista de fatores a ser considerada ao se avaliar o risco ambiental de uma dada substância química:

1. químicos (possíveis estados de oxidação, interações com outros materiais e impurezas, vias e produtos de degradação e biodisponibilidade, forma física);
2. potencial de biodegradação (demanda biológica e química de oxigênio, variação de temperatura, disponibilidade de oxigênio e biodegradação de produtos de interação);
3. testes de toxicidade aguda (microorganismos, plantas superiores, invertebrados, peixes, pássaros e mamíferos);
4. toxicidade crônica (espécies de peixes, cadeia alimentar de invertebrados e mamíferos mais significativos);
5. desaparecimento da atmosfera, águas de rios, lagos, solo;
6. bioacumulação em microorganismos, plantas superiores, invertebrados, peixes, pássaros, mamíferos e humanos;
7. eutroficação, ou seja, excesso de nutrientes em águas naturais (ensaios laboratoriais da resposta em algas e outras plantas aquáticas);
8. solos, lodo e sedimentos (acumulação e liberação de outros materiais por reações de troca ou pela modificação do meio); e
9. efeitos físicos (radiações).

Um aspecto desta lista que merece destaque é o problema do potencial de bioacumulação que ocorre quando uma substância é potencialmente tóxica e aparentemente persistente no ambiente, como, por exemplo, as substâncias lipossolúveis. Estas substâncias podem entrar na cadeia alimentar e causar dano à saúde de indivíduos que vivem distantes da fonte de emissão. Um exemplo típico é o metilmercúrio ou os compostos organoclorados que atingem populações humanas através da cadeia alimentar em peixes.

A avaliação de danos e riscos ambientais exige constante atualização de conhecimentos e não é algo que possa ser feito simplesmente por meio de medidas legislativas. No entanto, algumas generalizações podem ser feitas.

Em primeiro lugar, deve-se fazer uma estimativa dos níveis nos quais qualquer substância potencialmente tóxica estará presente no ambiente, disponível para ser absorvida por organismos vivos, inclusive o homem. Isto é uma estimativa da exposição provável. Em segundo lugar, deve-se estimar os níveis possíveis de dano aos organismos em risco, isto é, uma estimativa da relação dose-efeito ou dose-resposta sob condições previstas de exposição. Uma comparação destes dois tipos de dados indicará a possível margem de segurança se o agente químico considerado entrar no ambiente e seguir os padrões de uso, ou descarte da estimativa inicial. Somente quando a margem de segurança for bastante grande justifica-se o uso e o descarte de agentes químicos no ambiente.

Todas essas monitorações são importantes na avaliação do impacto ambiental que serve para identificar qual a possibilidade do dano e minimizá-lo.

A finalidade dos testes toxicológicos é, portanto, fornecer dados que possam ser utilizados para a avaliação do risco do uso da substância para o homem, desde que sejam definidos a substância química, os indivíduos expostos e as condições de exposição. A situação ideal seria aquela em que as condições de experimentação fossem idênticas às condições humanas.

A extrapolação dos dados animais para o homem e o estabelecimento de fatores de segurança para assegurar o mínimo de risco são de grande importância.

O fator de segurança varia de substância para substância, dependendo da natureza do efeito tóxico, do tipo e do tamanho da população exposta e da quantidade e qualidade das informações toxicológicas existentes.

Fatores de 1 a 5.000 podem ser empregados. Normalmente o limite de segurança para o homem é estabelecido a partir da dose sem efeito observável dividida pelo fator de segurança escolhido em função das informações acima. Por exemplo, para uma substância que produza efeito tóxico muito grave, que possua poucas informações toxicológicas e que possa contaminar grandes populações, um fator de 1.000 deve ser indicado.

## 4. BIBLIOGRAFIA

DRAIZE, J.H.; WOODARD, G.; CALVERY, H.O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.82, p.37-90, 1944.

HAYES, A.W. *Principles and methods in toxicology*. New York: Taylor & Francis, 2007. 2304p.

IPCS *Glossary of Exposure Assessment-Related Terms: A compilation*, 2001.

KLASSEN C. *CASARETT & DOULL'S Toxicology – The Basic Science of Poisons*. 6.ed., New York: McGraw-Hill, 2001.

ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. PROGRAMA Internacional de Segurança Química. *Segurança Química: fundamentos de toxicologia aplicada e características dos riscos causados por agentes químicos*. Tradução de Elizabeth de Souza Nascimento. São Paulo, Fundacentro, 1994. 97p.

SOMANI, S.M.; CAVENDER, F.L. *Environmental Toxicology – Principles and Policies*. Springfield, 1981.

WHO. *Principles and Methods for Evaluating the Toxicity of Chemicals*. Part I. EHC 6, 1978.

# 1.6.

# Avaliação do Risco

*Cristiana Leslie Corrêa, Herling Gregório Aguilar Alonzo* e
*Rosa Maria de Sá Trevisan*

SUMÁRIO

1. Introdução
2. Identificação do perigo
3. Caracterização do perigo
4. Avaliação da exposição
5. Caracterização e manejo do risco
6. Bibliografia

## 1. INTRODUÇÃO

Na Toxicologia, conceitua-se como **perigo** a capacidade de uma substância causar um efeito adverso e como **risco** a probabilidade de um evento nocivo ocorrer, devido à exposição a um agente químico e/ou biológico.

A **avaliação do risco** é um processo sistemático através do qual o perigo, a exposição e o risco são identificados e quantificados (Figura 1). Também é definida como a caracterização sistemática e científica dos efeitos adversos resultantes da exposição humana aos agentes químicos. Baseado nos resultados dessa avaliação e levando em consideração outros fatores, tal como os benefícios para a sociedade, um processo de tomada de decisão deve ser estabelecido no sentido de reduzir ao mínimo o risco que determinada substância química possa exercer para a saúde do homem. Avaliação de risco não é uma fórmula ou número, mas sim um delineamento analítico, que define o tipo de dados e a metodologia que são empregados para se avaliar o risco, onde também devem ser detalhadas as incertezas e os problemas associados com determinada avaliação.

Desta maneira, a avaliação do risco depende tanto do potencial do agente químico para causar danos (toxicidade), quanto da intensidade da exposição.

Dentre os primeiros esforços em promover limites de exposições seguras, por volta de 1940-1950, a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)* estabeleceu alguns níveis de exposição toleráveis para trabalhadores no ambiente ocupacional. Em seguida, Lehman e Fitzhugh (1954), toxicologistas da Agência Americana que regulamenta os alimentos e os medicamentos (*Food and Drug Administration* – FDA), publicaram um artigo que definia as bases do que hoje é conhecido como "Ingestão Diária Aceitável" (IDA), ou seja, a quantidade de um agente químico (aditivo e/ou praguicida) presente no alimento que pode ser ingerido através da dieta, diariamente, durante toda a vida do indivíduo, sem provocar risco de intoxicação ou aparecimento de efeitos nocivos. Em 1958, uma cláusula denominada *Delaney Clause* foi incluída na Lei Norte Americana, proibindo a adição de qualquer substância aos alimentos que possam causar câncer em animais e/ou no homem.

Somente na década de 1970, com a evolução do conceito da *Avaliação do Risco* é que esta surgiu como uma atividade organizada e desenvolvida pelas Agências Governamentais Federais Norte Americanas.

Durante muitos anos, os termos e os métodos utilizados na avaliação do risco para o homem não eram uniformes. Em 1983, a Academia Nacional de Ciências (*National Academy of Sciences – NAS*) dos EUA publicou um manual intitulado *Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process*, que passou a ser a base para todo processo de avaliação do risco, no qual se destacam algumas definições:

| | |
|---|---|
| **Perigo** | Capacidade da substância em causar um efeito adverso. |
| **Risco** | Probabilidade de ocorrência de perigo sob condições específicas de exposição. |
| **Avaliação do risco** | Processo pelo qual o perigo, a exposição e o risco são determinados. |
| **Manejo do risco** | Processo pelo qual são avaliadas as opções políticas e selecionada a medida regulatória mais apropriada com base nos resultados da avaliação do risco e nos interesses sociais, econômicos e políticos. |

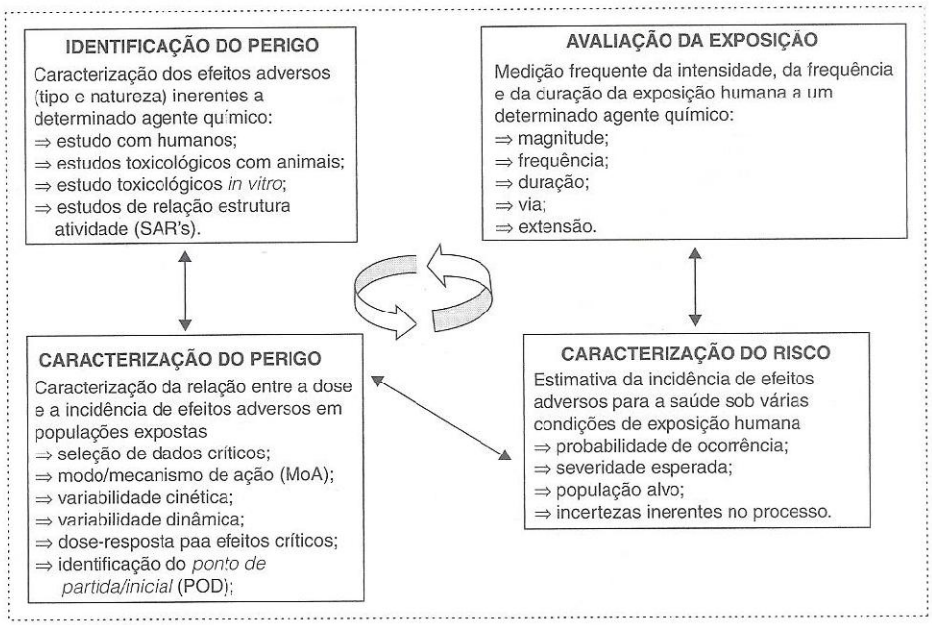



**Figura 1.** Descrição das quatro etapas principais no processo de avaliação do risco. (Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004)

Dessa forma, os principais objetivos da Avaliação do Risco incluem: a análise da relação entre o risco e o benefício; o estabelecimento de alvos e de níveis de segurança; e o auxílio na definição das atividades prioritárias dos programas de vigilância e de controle empreendidos por agências regulatórias, indústrias, organizações ambientais e de consumidores.

## 2. IDENTIFICAÇÃO DO PERIGO

Na fase da identificação do perigo, investiga-se se o agente químico pesquisado apresenta capacidade de causar um efeito adverso e estabelece-se a natureza dos efeitos presentes numa população ou num ecossistema.

Nessa etapa, são utilizam-se principalmente dados provenientes de estudos em animais de experimentação e/ou de estudos clínicos ou estudos epidemiológicos em populações expostas.

Nas experimentações realizadas com animais (toxicidade aguda, subaguda, crônica, carcinogenicidade, toxicidade na reprodução e no desenvolvimento e neurotoxicidade, entre outros), a abordagem tradicional determina o limiar de toxicidade (*threshold*) pelo estabelecimento do nível de dose, no qual não são observados efeitos adversos – NOAEL (*No Observable Adverse Effect Level*) e da menor dose na qual são observados efeitos adversos – LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*). A determinação desta dose limiar é ditada pela seleção de doses do estudo de toxicidade. Uma alternativa a esta abordagem chama-se *Benchmark Dose* (BMD), que envolve a aplicação de um modelo matemático nos dados de dose-resposta para um determinado *endpoint*, permitindo ao modelo estimar um limiar de dose correspondente à resposta *Benchmark* (BMR) e posteriormente estabelecer uma dose efetiva (ED – *effective dose*). Exceção a estas determinações ocorre nos estudos de toxicidade aguda onde se objetiva identificar a DL50, ou seja, dose letal em 50% dos animais. A descrição completa da importância e da forma de realização dos experimentos com animais está presente no capítulo "Avaliação da Toxicidade" deste livro.

**Tabela 1.** Descrição de vantagens e desvantagens da utilização de estudos epidemiológicos, clínicos e toxicológicos em animais de experimentação para a identificação do perigo.

| Tipo de estudo | Vantagens | Desvantagens |
|---|---|---|
| Epidemiológicos | – condições reais de exposição.<br>– ocorrência de efeitos através da associação com diversas outras substâncias químicas.<br>– efeitos mensurados na espécie de interesse.<br>– ampla abrangência da susceptibilidade humana freqüentemente expressada. | – tempo e investimento.<br>– *post facto*, ou seja, não promove proteção à saúde pública.<br>– dificuldade em definir a exposição, problemas com confluência de exposição.<br>– o risco deve ser aumentado para poder ser detectado.<br>– efeitos mensurados não fornecem detalhamento (morbidade, mortalidade).<br>– viés de seleção, de informação e variável de confundimento. |
| Clínicos | – bem definido, condições de exposição controladas.<br>– respostas medidas em seres humanos.<br>– capacidade de estudar subpopulações (p.ex., asmáticos).<br>– capacidade de mensurar efeitos relativamente raros. | – custoso.<br>– exposições em curto-prazo e em concentrações relativamente baixas.<br>– limitado a grupos relativamente pequenos (geralmente < 50 indivíduos).<br>– limitado a efeitos reversíveis, leves e em curto-tempo.<br>– usualmente grupos mais susceptíveis não são apropriados para o estudo. |
| Animais de experimentação | – condições de exposição facilmente manipuladas.<br>– capacidade de mensurar muitos tipos de resposta.<br>– capacidade de avaliar inúmeras características do hospedeiro (p.ex., gênero, idade, genética) e outros modificadores (p.ex., dieta) da resposta.<br>– capacidade de avaliar mecanismos. | – incertezas na relevância da resposta animal para exposição humana.<br>– controle de alojamento, dieta etc., de relevância questionável para seres humanos.<br>– concentrações e tempo de exposição são freqüentemente diferentes dos animais para os seres humanos. |

Outros fatores são levados em consideração na avaliação da relevância dos dados de toxicidade de um agente químico, são eles: a qualidade dos dados, o tipo de estudo, a via e a duração da exposição, as doses utilizadas e a reprodutibilidade do estudo. Para atender a estes requisitos os estudos devem seguir protocolos (*guidelines*) publicados por entidades internacionalmente reconhecidas, tais como a Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico (OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development*) e/ou a Agencia de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA – *Environmental Protection Agency*). Ressalta-se que, necessariamente, esses estudos devem ser conduzidos de acordo com as Boas Práticas Laboratoriais (BPL).

Além disso, os dados obtidos de estudos celulares e bioquímicos podem ajudar a predizer possíveis respostas para o homem. A toxicidade também pode ser predita, baseando-se na similaridade da estrutura química de uma substância com outra, cuja toxicidade já é conhecida.

## 3. CARACTERIZAÇÃO DO PERIGO

A base fundamental da relação quantitativa entre a exposição a um agente e a incidência de uma resposta adversa é chamada de caracterização do perigo ou avaliação dose-resposta. Seu objetivo é *quantificar* o perigo, previamente descrito na etapa anterior como *Identificação do Perigo* e embasar a escolha dos *endpoints* de relevância e dos níveis de dose, onde não são observados efeitos adversos (NOAEL) que, por sua vez, deverão ser utilizados no processo de caracterização do risco à saúde humana da população alvo.

Nesta etapa, quando os dados da exposição do homem a um agente tóxico não são suficientes para predizer uma resposta, é necessário utilizar dados obtidos em ensaios com animais para estabelecer a relação dose-resposta. Dois tipos de extrapolação são necessários: quantitativa, que envolve a extrapolação das altas doses utilizadas nos experimentos para aquelas presentes na exposição ambiental (geralmente, baixas doses), e a qualitativa, que envolve a extrapolação dos resultados em animais para o homem.

Desta forma, propõe-se utilizar fatores de incerteza e/ou de variabilidade, quando se necessita: realizar extrapolação inter-espécie; considerar a variação intra-espécie; empregar valor de LOAEL ao invés de NOAEL; utilizar dados de estudo subcrônico ao invés de crônico, quando se considera exposição a longo prazo; e considerar se o banco de dados está incompleto. A Tabela 2 apresenta uma breve descrição dos fatores de incerteza típicos utilizados por algumas agências governamentais ou institutos.

**Tabela 2.** Descrição dos principais fatores de incerteza e/ou variabilidade aplicados para a obtenção de doses seguras.

| Fator de incerteza | | Agência | |
|---|---|---|---|
| | *IPCS*[1] | *ATSDR*[2] | *EPA*[3] |
| Interespécie | 10 (2,4[4] x 4,0[5]) | 10 | 10 |
| Intra-espécie | 10 (3,16[4] x 3,16[5]) | 10 | 10 |
| LOAEL para NOAEL | – | 10 | ≤ 10 |
| Subcrônico para crônico | – | NA[6] | ≤10 |
| Banco de dados incompleto | 1-100 | NA[6] | ≤10 |

[1] IPCS – *International Programme on Chemical Safety*;

[2] ATSDR – *Agency for Toxic Substance and Disease Registry*/ Estados Unidos;

[3] EPA – *Environmental Protection Agency*/ Estados Unidos;

[4] Variabilidade dinâmica;

[5] Variabilidade cinética;

[6] Não aplicado.

O aumento no conhecimento da sensibilidade interespécie e intra-espécie, dos mecanismos e modos de ação e da avaliação crítica e detalhada do banco de dados favorecem o uso de dados de toxicidade em animais, resultando numa avaliação do risco de maior confiabilidade. A escolha dos fatores de incerteza e/ou variabilidade requer julgamento científico que deve ser feito numa abordagem caso a caso.

Na escolha dos *endpoints* (efeitos críticos de relevância), a abordagem através do peso da evidência envolve avaliação e consideração de todos os dados e informações biológicas e estatisticamente relevantes, disponíveis para uma determinada substância química, auxiliando no fornecimento de um cenário geral dos efeitos da substância química e da sua relação dose-resposta. Por esta razão, estudos individuais são vistos no contexto de outras informações sobre o agente químico e não isoladamente. Novamente, o julgamento científico baseado na ciência e na razão deve ser usado na implementação da abordagem pelo peso da evidência, para selecionar corretamente os *endpoints* de toxicidade.

Os efeitos não-carcinogênicos apresentam limiares de dose abaixo dos quais o efeito não ocorre. A menor dose que não apresenta efeito em estudos com animais ou com homens é dividida pelos fatores de incerteza para fornecer uma margem de segurança. Não se considera a existência de um limiar para os efeitos carcinogênicos e, por este motivo, o risco

de exposição a uma substância com potencial carcinogênico em baixas doses pode ser calculado por modelos matemáticos como uma probabilidade de ocorrência (ex: 1 caso em 1.000.000).

A caracterização do perigo para substâncias que apresentam limiar de resposta envolve o cálculo de Doses de Referência (RfD – *Reference Dose*), que são conhecidas como doses às quais a população pode estar exposta diariamente sem apresentar risco de aparecimento de efeitos nocivos à saúde durante toda a vida. Um conceito semelhante é utilizado para calcular os níveis de exposição crônica permissíveis para o homem a resíduos de praguicidas e aditivos alimentares. Esse conceito é conhecido como Ingestão Diária Aceitável (IDA) e baseia-se nos efeitos não-carcinogênicos de agentes químicos.

Para determinar os valores das doses de referência e da IDA, o nível no qual não são observados efeitos adversos (NOAEL) é dividido por fatores de segurança ou incerteza para fornecer uma margem de segurança permissível para a exposição humana.

Além da Ingestão Diária Aceitável e da Dose de Referência, outros níveis permissíveis de exposição utilizados são estabelecidos de maneira semelhante, tais como: o nível de risco mínimo (MRL – *Minimal Risk Level*), adotado pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR); os valores limites (TLVs – *Threshold Limit Values*); os limites permissíveis de exposição (PELs – *Permissible Exposure Levels*), utilizados pelo Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH), dos EUA, para representar a dose que não produzirá efeitos adversos à saúde do trabalhador após exposições diárias e repetidas no local de trabalho; e a margem de exposição (MOE – *Margin of exposure*) e/ou nível de exposição aceitável do trabalhador (AOEL – *Acceptable Operator Exposure Levels*), que é a medida do risco a que os trabalhadores estão expostos, através da determinação da proximidade desta exposição ocupacional (dérmica ou inalatória) ao NOAEL.

Ressalta-se que a caracterização do perigo deve ser considerada juntamente com os potenciais cenários de exposição para um determinado agente químico.

## 4. AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO

O objetivo da avaliação da exposição é a mensuração da intensidade, da freqüência e da duração da exposição humana a um agente presente no meio ambiente, ou a estimativa de exposições hipotéticas que podem surgir pelo uso de determinadas substâncias químicas. Na sua forma mais complexa, ela descreve: a magnitude, a duração e a via de exposição, o tamanho, a natureza e a classe da população exposta, e as incertezas deste processo.

O conceito de exposição a uma substância química pode ser abordado sob dois aspectos: o primeiro, como contato de uma substância química com as barreiras externas do indivíduo, representadas pela pele, pelo trato digestivo e pelo trato respiratório; e o segundo, como a estimativa qualitativa e quantitativa deste contato. Além disso, são estimadas as proporções da substância química que atravessam essas barreiras externas, predizendo assim a dose interna (Figura 2).

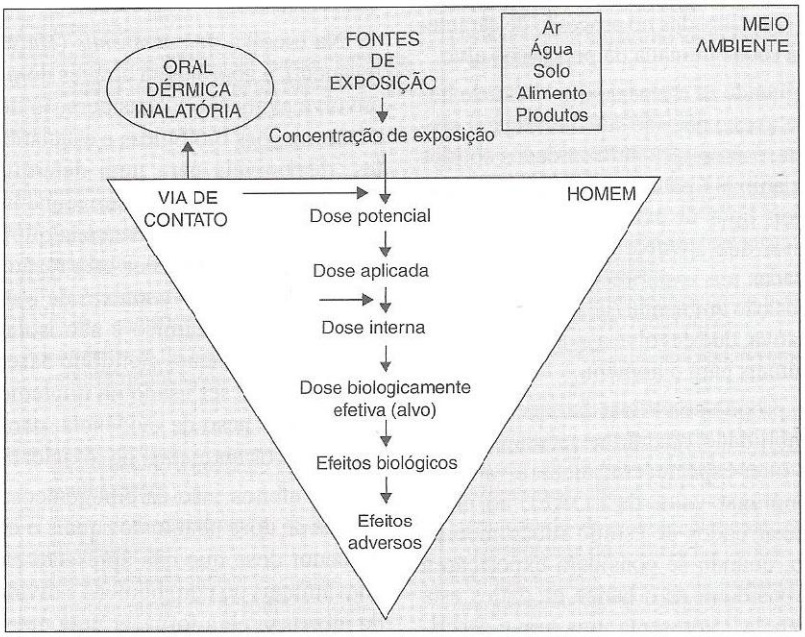



**Figura 2.** Conceitos importantes aplicados no processo de avaliação da exposição. (Fonte: Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999.)

Na maioria das vezes, a substância química está no ar, na água, no solo ou em um produto ou outro meio carreador. A concentração de substância química no ponto de contato corresponde à concentração de exposição. A exposição que ocorre durante um período de tempo pode ser representada por uma relação na qual a concentração de exposição é tempo-dependente.

A etapa da avaliação da exposição inclui três fases: 1) caracterização da fonte de exposição; 2) identificação dos meios de exposição (água, solo, ar, contato direto ou por alimentos) e das vias de exposição (dérmica, inalatória ou oral); e 3) quantificação da exposição.

As principais variáveis estudadas na avaliação da exposição são: populações expostas (público em geral ou grupos selecionados); tipos de substâncias (produtos farmacêuticos, substâncias químicas industriais ou poluentes ambientais); substâncias únicas ou misturas; duração da exposição (curta, longa ou esporádica); meios de exposição e vias de exposição.

O avaliador da exposição deverá primeiramente identificar o meio de contato e as populações potencialmente expostas. Alguns grupos populacionais podem estar sob maior risco, devido a níveis mais altos de exposição ou por possuírem maior susceptibilidade (crianças, idosos, gestantes, portadores de doenças crônicas, entre outros).

A concentração ou a dose potencial de contato pode ser quantificada por meio de medidas diretas ou indiretas. As mais importantes são:

- **Medição direta da dose potencial de contato** (barreira externa do organismo), realizada enquanto ocorre a exposição, mensurando e, posteriormente, integrando esta dose com o tempo de exposição. Pode ser realizada por técnicas de monitoramento individual.
- **Medição da concentração do agente químico no meio, onde ocorre o contato** (exposição), realizada por mensurações ambientais em função do tempo de exposição. Essas mensurações se dão nos cenários de exposição e são conhecidas como medidas indiretas da exposição.
- **Estimativa de dose potencial**, determinada pelos indicadores internos (biomarcadores de efeito e dose interna) após a exposição ter ocorrido. Essa medida indireta pode ser obtida através de estudos de biomonitoramento.

Essas três formas de quantificação da exposição ou da dose potencial são independentes, uma vez que são baseadas em dados ou estudos distintos. É importante ressaltar que todas essas formas têm limitações, todavia a credibilidade da avaliação de exposição e de risco, pode ser melhorada pela utilização concomitante de uma delas.

Dados qualitativos obtidos por meio de questionários e de modelos de dispersão também são freqüentemente utilizados. A avaliação da exposição pode requerer a determinação das emissões, dos meios, das vias de movimentação e da biodegradação da substância, de forma a estimar a concentração à qual podem estar expostos a população humana e/ou os compartimentos ambientais, como água, solo e ar.

Dependendo do propósito da avaliação, a estimativa da exposição pode resultar em uma freqüência ou, então, em dados numéricos, que representem a intensidade, a taxa e a duração da exposição. A dose de contato obtida ou calculada é expressa geralmente em mg/kg de peso corpóreo/dia, para facilitar a comparação com os dados obtidos na caracterização do perigo.

A avaliação da exposição é uma etapa fundamental do processo de avaliação do risco, uma vez que, se não houver exposição, até mesmo uma substância altamente tóxica não representa uma ameaça.

## 5. CARACTERIZAÇÃO E MANEJO DO RISCO

A caracterização do risco é a etapa final desta avaliação e envolve a predição da freqüência e da severidade dos efeitos adversos numa população exposta. A caracterização do risco integra os dados obtidos com identificação do perigo, caracterização do perigo e da exposição, gerando evidências sobre o risco da exposição a um agente químico, sob determinadas condições, para a tomada de decisões futuras.

A Tabela 3 apresenta um esquema simplificado de interpretação do processo de caracterização do risco. Ela revela que o risco elevado está diretamente associado com uma probabilidade maior de ocorrência de efeitos adversos.

**Tabela 3.** Interpretação simplificada do processo de caracterização do risco.

| Toxicidade | Exposição | Risco |
|---|---|---|
| Alta | Alta | Muito alto |
| Alta | Média | Alto |
| Alta | Baixa | Alto / Médio |
| Alta | Muito baixa | Médio / Baixo |
| Média | Alta | Alto / Médio |
| Média | Média | Médio |
| Média | Baixa | Baixo / Médio |
| Baixa | Alta | Baixo / Médio |
| Baixa | Média | Baixo |
| Baixa | Baixa | Sem importância |

Fonte: Adaptado de TORDOIR, MARONI, 1994.

De acordo com a severidade dos efeitos adversos e de sua probabilidade de ocorrência, verifica-se se o risco estimado é negligenciável, tolerável ou intolerável. Além da avaliação com base científica, a interpretação do risco também é vinculada à percepção pessoal. Alguns exemplos das diferentes percepções em relação ao risco estão descritos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Fatores que podem influenciar a percepção ao risco.

| Riscos tolerados | Riscos não tolerados |
|---|---|
| Voluntariamente assumido | Imposto por outros |
| Alto benefício pessoal percebido | Não percebido nenhum benefício pessoal |
| Concordância dos cientistas | Discordância dos cientistas |
| Não catastrófico | Catastrófico |
| Origem natural | Origem industrial |
| Perigo não perceptível | Perigo altamente perceptível |
| Evento comum | Evento raro |
| Distribuído igualmente (eqüidade) | Distribuição desigual |

Portanto, a caracterização do risco representa um importante elo entre os dados científicos obtidos nos diferentes estudos e as decisões governamentais e de ordem política quanto à regulamentação, ao gerenciamento e à comunicação do risco.

Durante o processo de registro de comercialização de substâncias químicas, podem ser solicitadas informações adicionais para refinar a avaliação do risco, que subsidiem decisões quanto às medidas mitigadoras. Os processos de avaliação de risco e do manejo do risco estão intimamente relacionados e visam o emprego de técnicas de controle adequadas e o estabelecimento de níveis de risco aceitáveis (Figura 3).

No processo de manejo do risco, outros aspectos envolvidos são avaliados, tais como: a importância social do risco; qual será o risco mínimo ou aceitável; necessidade de se buscar alternativas para redução do risco; austeridade da redução do risco e das medidas mitigadoras; estudo dos fatores econômicos envolvidos; prioridades de preocupações e ações; necessidade de ferramentas legais e, por fim, a análise da percepção do risco (avaliar, decidir e *implementar)*.

O processo de avaliação do risco vem sendo empregado internacionalmente, seguindo as diretrizes da segurança química, com o propósito de prevenir os danos à saúde e ao meio ambiente, proporcionados pelo contato, pelo uso e/ou pelo manuseio de substâncias químicas.

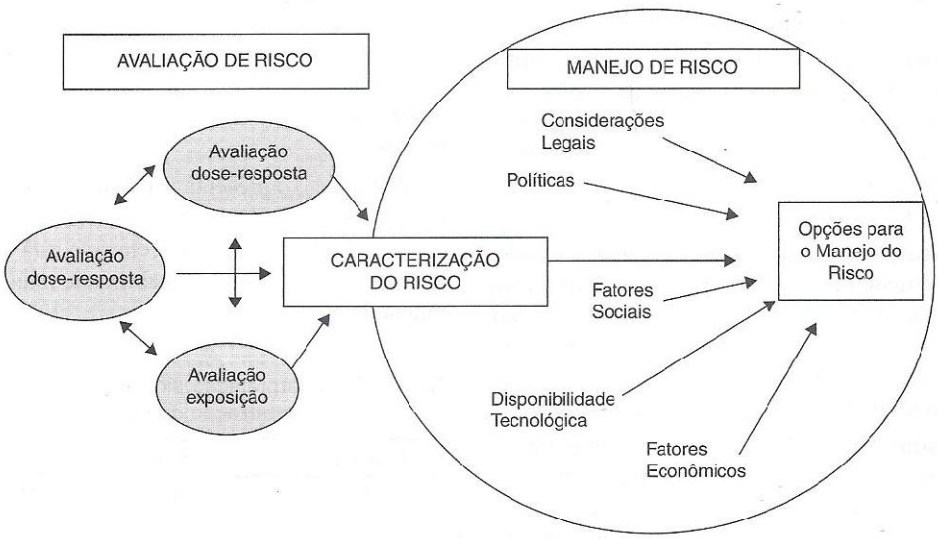



**Figura 3.** Integração dos dados de caracterização e manejo do risco.

## 6. BIBLIOGRAFIA

BARNES, DOURSON, M. Reference Dose (RfD): Description and Use in Health Risk Assessment. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, vol.8, p.471-486, 1988.

BENFORT, D. *Principles of Risk Assessment of Food and Drinking Water Related to Human Health*. Brussels, Belgium: International Life Sciences Institute, 2001.

DAUGHERTY, J.E. *Assessment of chemical exposures: calculation methods for environmental professionals*. Boca Raton: Lewis, 1998. 439p.

FAUSTMAN, E.H., OMENN, G.S. Risk assessment. In: KLAASSEN, C.D. ed. *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. 5.ed. New York: Int. Ed. McGraw-Hill, 1996. cap.4, p.5-88.

GRAHAM, J.D. Historical perspective on risk assessment in the federal government. *Toxicology*, v.102, p.29-52, 1995.

HAYES, A.W. ed. *Principles and methods of toxicology*. 4.ed. Philadelphia: Taylor and Francis, p.47-49, 2001.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. Clinical Chemistry Division. Commission on Toxicology. *Glossary for Chemists of Terms used in Toxicology (IUPAC Recommendations 1993)* [Online]. Disponível em: http://sis.nlm.nih.gov/main.htm.

LIOY, P.J. Exposure analysis: reflections on its growth and aspirations for its future. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology*, v.9, n.4., p.273-281, 1999.

National Academy of Science (NAS): *Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process*, National Academy Press, Washington, DC, 1983. apud: NORTH, B.E. Human health risk assessment infotext®: regulations, standards and general information. (INFOTEXT® system). In: HALL, A.H.; RUMACK, B.H. eds. *TOMES® System* [CD-ROM]. MICROMEDEX, Inc., Englewood, Colorado (Edition expires: October, 1998). 21p.

RODRICKS, J.V. Historical Perspective of Risk Assessment and Review of Steps in the Process. In: INSTITUTE OF MEDICINE. *Food Safety Policy, Science and Risk Assessment*: Strengthening the Connection: Workshop Proceedings. [S.I.]: [s.n.], 2001.

RODRICKS, J.V. *Calculated risks: understanding the toxicity and human health risks of chemicals in our environment*. Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 256p.

ROWLAND, J. *G2004.01: Guidance for Hazard Identification and Toxicity Endpoint Selection*. Washington, D.C., U.S.: United States Environmental Protection Agency, 2004.

TORDOIR, W.F.; MARONI, M. Basic concepts in the occupational health management of pesticide workers. *Toxicology*, v.91, p.5-14, 1994.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for exposure assessment. Washington, DC, Federal Register, 57: 22888, 1992. 164p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *General scientific principles of chemical safety*. Geneva, 2000. 205p. (International Programme on Chemical Safety, Training Module No. 4)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Principles for modeling dose-response for the risk assessment of chemicals: Environmental Health Criteria XXX Draft*. Geneva: International Programme on Chemical Safety, 2004. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm. Acesso em: 07 Ago. 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Principles for the Assessment of Risks to Human Health from Exposure to Chemicals: Environmental Health Criteria 210*. Geneva: International Programme on Chemical Safety, 1999. Disponível em: http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc210.htm. Acesso em: 13 Jun. 2006.